

**単一タンパク質蛍光寿命相関が示す  
光合成エネルギー輸送を制御する複数の局所的構造ダイナミクス**

<sup>1</sup>マサチューセッツ工科大学, <sup>2</sup>MIT-Harvardエキシトン工学センター, <sup>3</sup>ヴェローナ大学  
○近藤徹<sup>1,2</sup>, Gordon Jesse<sup>1,2</sup>, Pinnola Alberta<sup>3</sup>, Dall'Osto Luca<sup>3</sup>, Bassi Roberto<sup>3</sup>,  
Schlau-Cohen Gabriela<sup>1,2</sup>

**Single-molecule fluorescence lifetime correlation revealed multiple protein dynamics regulating photosynthetic energy transport**

○Toru Kondo<sup>1,2</sup>, Jesse Gordon<sup>1,2</sup>, Alberta Pinnola<sup>3</sup>, Luca Dall'Osto<sup>3</sup>, Roberto Bassi<sup>3</sup>,  
Gabriela Schlau-Cohen<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology, USA*

<sup>2</sup> *MIT-Harvard Center for Excitonics, USA*

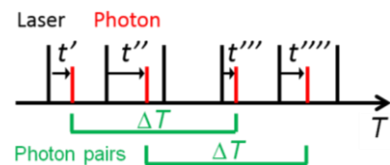
<sup>3</sup> *Department of Biotechnology, University of Verona, Italy*

**【Abstract】** Fluorescence intensity correlation analysis of single molecules is used to estimate protein conformational dynamics, but the time resolution is restricted due to the binning of photon data. Recently, in order to overcome this limitation, two-dimensional fluorescence lifetime correlation (2D-FLC) analysis was developed [1, 2]. The lifetime-based approach without binning identifies fast dynamics even on the microsecond time scale [3]. However, if the system contains a number of fluorescence emitters, each of which is associated with discrete dynamics, the analysis could obscure the dynamics. Here, we developed a correlation analysis for multiple independent dynamics in single chromoproteins. The new approach allowed the identification of multiple dynamics in photosynthetic light-harvesting complexes (LHCs) from the fluorescence intensity and lifetime as well as the time scale of dynamics. The LHCs, absorbing and transporting light energy, contain chlorophyll (Chl) and xanthophyll carotenoid (Xan). The Xan serves as a quencher of excess light energy on Chls. Therefore, the dynamics around Chl and Xan can regulate the light harvesting. We revealed that multiple dynamic components individually contribute to the energy transport function of LHCs, leading to photosynthetic photoprotection.

**【序】** 近年、タンパク質構造ダイナミクスの生体機能への寄与が明らかになってきた。タンパク質の動的物性解析には、単一タンパク質蛍光分光が広く用いられている。単一タンパク質の蛍光時間変化を測定すると、タンパク質構造ダイナミクスを反映した蛍光揺らぎを観測できる。タンパク質の準安定構造ごとに蛍光強度が異なるので、強度変化を調べれば構造状態の分布が調べられる。強度状態ごとに寿命を見積もれば、強度・寿命の2D分布も得られ、それを基に状態間のダイナミクス速度が評価できる [4]。しかし、蛍光強度を見積もる際にはある程度の積算時間が必要なため、時間分解能が制限されてしまう。従って、速いダイナミクスは解析できない。

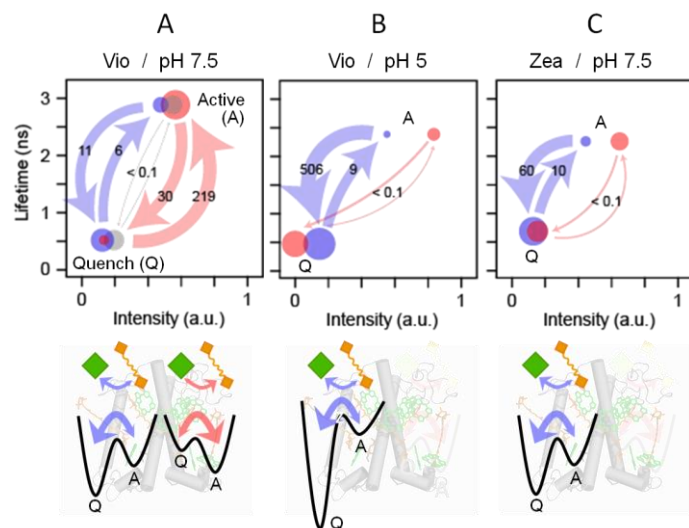
そこで最近、時間相関単一光子計数法 (TCSPC) で得た蛍光光子データを、蛍光寿命を基に解析する2次元蛍光寿命相関法 (2D-FLC) が開発された [1, 2]。時間積算することなく、光子そのものの寿命相関を解析するため、 $\mu$  秒スケールで生じる速いダイナミクスが解析可能である [3]。一方で、これまでの解析では、多数の蛍光体が関与する複数のダイナミクスを同定するのは難しかった。そこで我々は、解析手法を改良し、複数の蛍光体を含む光合成アンテナタンパク質 LHCSR1 の解析を行った [5]。

**【実験】** Ni-NTA でコートしたカバーガラスに、His-tag 修飾した LHCSR1 を固定した。単一タンパク質を 640 nm のレーザーパルスで励起し、TCSPC で蛍光光子データを測定した。各光子ごとに、観測時間  $T$  と蛍光寿命時間  $t$  (パルス励起から蛍光光子検出までの時間) が得られる (図 1)。 $\Delta T$  だけ時間間隔をおいて検出される 2 つの光子から、1 組の寿命時間セット ( $t_1, t_2$ ) が得られるので、 $t_1$ - $t_2$  の 2 次元プロットができる。全光子ペアについてプロットし、2 次元蛍光減衰 (2D-FD) を得る。それを Fitting 解析し、2 次元寿命相関 (2D-FLC) を見積もった。様々な  $\Delta T$  で同様に解析し、 $\Delta T$  に関する相関関数を得た。それを Fitting 解析し、ダイナミクス成分の数 (蛍光体の数)、蛍光寿命状態および各々の蛍光強度、状態間の遷移速度、を求めた。結果はダイアグラムとしてまとめた (図 2)。解析プログラムは全て MatLab で作成した。



**Figure 1.** Fluorescence photon data measured by TCSPC

**【結果】** 単一 LHCSR1 の蛍光光子データを解析した。長寿命 (Active) と短寿命 (Quench) の 2 つの蛍光寿命状態が観測され、2 状態間の遷移として 3 つの成分が同定された (図 2A 上)。Active 側に偏った成分 (赤)、Quench 側に偏った成分 (青)、遷移速度が遅くほぼ止まっている成分 (灰色)、に分類できる。LHCSR1 には 8 個のクロロフィル  $a$  分子 (Chl) と 4 個のカロテノイド分子 (Car) が結合しており、Chl が蛍光体、Car がエネルギー消光体として機能する。従って、Active $\leftrightarrow$ Quench 状態間での遷移は、Chl-Car 近傍の構造ダイナミクス (分子の相対配置の変動) による蛍光強度と寿命の増減を反映している (図 2A 下)。観測された 3 つの成分は、異なる



**Figure 2.** Diagrams of multiple dynamic components in single LHCSR1s with Vio at pH 7.5 (A) and 5 (B) and with Zea at pH 7.5 (C). Circle size and arrow thickness exhibit a relative population and transition rate between active and quenched states, respectively. Numbers on the arrow indicate a transition rate in 1/s. Bottom panels show schematics of protein conformational dynamics associated with Chl-Car pairs as well as potential energy landscapes.

Chl-Car 対の近傍で生じる構造ダイナミクスに対応する。特に、Active 側と Quench 側に偏った成分に対応する 2 つの Chl-Car 対が、光エネルギーの輸送量を制御している。

実際の生体系では、太陽光の強度が高くなると光合成光反応の頻度が上がり、結果として生体膜内の pH が低下する。pH 低下は①タンパク質の構造変化と②Car 分子の分子組成変化 (Vio $\rightarrow$ Zea) を誘起する。そこで、低 pH 条件及び Zea 結合条件で LHCSR1 を解析した。低 pH では Active 成分の動きが止まり、Quench 成分はより Quench 側に偏った (図 2B)。また、Zea 結合により Active 成分が止まった (図 2C)。つまり、LHCSR1 は光環境変化に応答して、異なる Chl-Car 対のダイナミクス特性を各々別々に調整している。このように、新たな解析法を用いることで、光合成エネルギー輸送を制御する複数の局所的構造ダイナミクスの同定が可能となった。

**【参考文献】** [1] Ishii, K. and Tahara, T., *J. Phys. Chem. B* 117, 11414 (2013); [2] Ishii, K. and Tahara, T., *J. Phys. Chem. B* 117, 11423 (2013); [3] Otsu, T., et al., *Nat. Comm.* 6, 7685 (2015); [4] Kondo, T., et al., *Nat. Chem.* 9, 772 (2017); [5] Kondo, T., et al., *to be submitted*.

## 水のO-H伸縮振動のラマンバンドを用いた 細胞内温度のラベルフリー可視化

<sup>1</sup>東北大薬, <sup>2</sup>東北大院薬  
○杉村俊紀<sup>1</sup>, 梶本真司<sup>1,2</sup>, 中林孝和<sup>1,2</sup>

### Label-Free Visualization of Intracellular Temperature Using O-H Stretching Raman Band of Water

○Toshiki Sugimura<sup>1</sup>, Shinji Kajimoto<sup>1,2</sup>, Takakazu Nakabayashi<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan

**【Abstract】** Observation of temperature distribution inside a cell is important to understand physiological phenomena such as respiration, division, and differentiation. In recent years, temperature-sensitive fluorescent molecules were synthesized and used for visualization of intracellular temperature, whereas there are various disadvantages such as the necessity of pretreatments and photobleaching. In this study, we have proposed a label-free method for measuring intracellular temperature using Raman images of a cell in the O-H stretching band region. We measured Raman spectra of buffer medium and Raman images of HeLa cells at various temperatures and calculated the intensity ratio at two wavenumbers in the O-H stretching band. The intensity ratios both of buffer and cells are changed linearly with temperature, which can be used as calibration curves for temperature. We applied the present method for observing the increase in intracellular temperature after the treatment of 2,4-dinitrophenol, which has the effect of increasing intracellular temperature.

**【序】** 細胞小器官レベルの温度センシングは、細胞の基本的な生理機能の理解に対して有効であると考えられる。しかし、細胞内の温度が各小器官でどのように異なるのか、呼吸などの生理現象に対して、細胞内の温度がどのように変化するかなどは、殆ど理解されていない。このような背景から、温度感受性蛍光分子を用いた細胞内温度の測定が盛んに行われている[1,2]。しかし、蛍光分子を細胞内に導入する必要があるために、細胞内環境を変化させる可能性や前処理の必要性といった欠点がある。また、pH や極性などの周囲の環境によっても蛍光は変化するため、蛍光による温度の見積もりには注意が必要である。

そこで本研究では、細胞内温度をラベルフリーで可視化することを目的とし、細胞内の水分子の O-H 伸縮振動バンドを用いて、細胞内温度を計測できることを提案する。水の O-H 伸縮振動バンドの形状は、温度に依存して変化することが知られている[3]。我々は O-H 伸縮振動バンド上の 2 点について、その比が温度に対して鋭敏に変化することに着目し、温度に対する培地、核、細胞質それぞれの検量線を得ることができた。これらの検量線を用いて、酸化的リン酸化の進行を妨害(脱共役)させる DNP (2,4-Dinitrophenol) を細胞内に導入し、脱共役に伴う温度上昇の可視化を行った。

**【実験】** 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[4]。励起波長は 532 nm である。HeLa 細胞を試料として用い、ガラスベースディッシュ上に DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培地で培養した。測定する直前に、培地を自家蛍光成分の無い Hanks' balanced salt solution (HBSS)

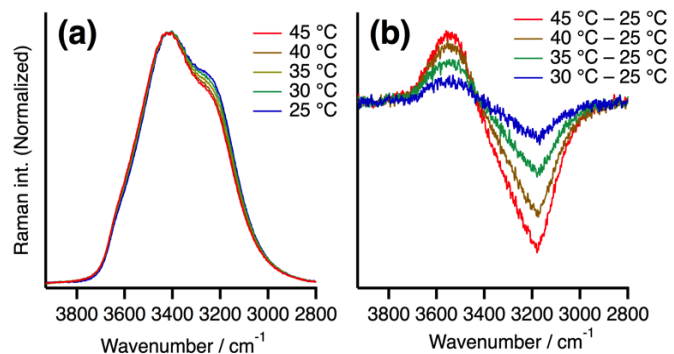
に置換し、30 ~ 40°C の範囲で変化させ、各温度の細胞のラマンイメージングを測定した。細胞のイメージから、核、細胞質、培地の領域を抽出し、それぞれの O-H 伸縮振動バンドの強度比を求め、検量線を作成した。また HBSS のみでも、O-H 伸縮バンドの強度比の温度依存性を測定し、検量線を得た。次にディッシュ上の HBSS を DNP 2 mM 溶液に置換し、置換に伴う細胞内および培地の温度変化を検討した。

**【結果・考察】** Fig. 1a に HBSS の温度を 25 から 45°C まで 5°C 刻みで変化させた時のラマンスペクトルを示す。また、30 ~ 45°C のスペクトルと 25°C のスペクトルの差スペクトルを Fig. 1b に示す。差スペクトルでは正負の 2 つのピークが観測され、温度上昇に応じて、高波数側の強度が増加し、低波数側の強度が減少した。この結果は[3]の結果とも一致し、温度上昇に伴う水素結合の変化を反映している。各温度の HBSS の O-H 伸縮振動バンド (Fig. 1a) について、Fig. 1b の正負ピークの波数位置での強度比をとり、温度に対してプロットした結果を Fig. 2 に示す。温度に対して線形的に強度比が変化しており、一次関数の検量線を得ることができた。核と細胞質についても、同様に O-H 伸縮振動バンドの強度比を温度に対してプロットした (Fig. 2、核 (赤)、細胞質 (緑))。核と細胞質の強度比も温度に対して線形的に変化しており、O-H 伸縮振動バンドの強度比から、細胞内温度が求められることを提案することができた。

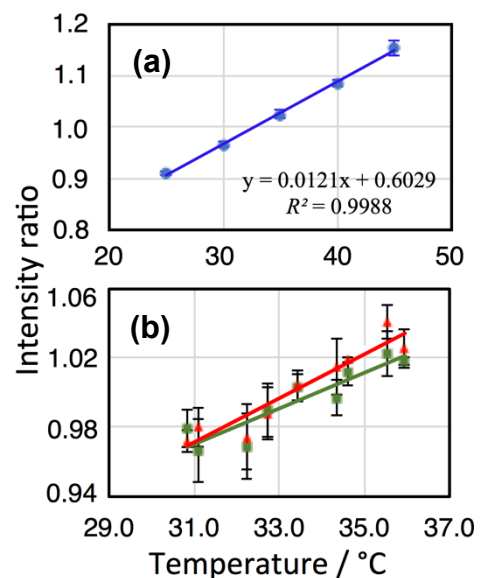
これらの結果を用いて、DNP の添加に伴う細胞内の温度上昇の検出を行った。DNP は脱共役によって呼吸を阻害させ、細胞内の温度を上昇させると考えられている。DNP を細胞培養する培地に添加すると、細胞内の温度が増加し、熱伝達によって周囲の培地も温度が上昇することを検出することができた (Fig. 3)。本手法が、細胞内及び培地温度を測定・可視化できていることを示している。

### 【参考文献】

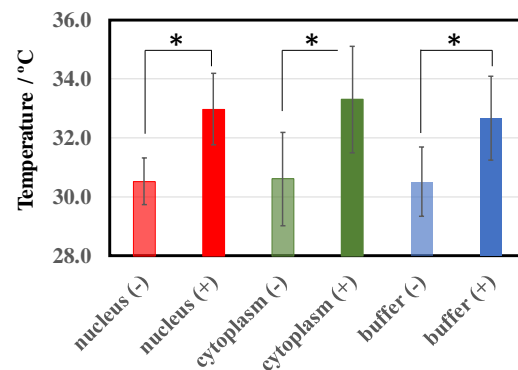
- [1] K. Okabe et al., *Nat. Comm.* 3, 705 (2012)
- [2] S. Kiyonaka et al., *Nat. Methods.* 10, 1232 (2013)
- [3] S. Qian et al., *Vib. Spectrosc.* 5, 110 (2012)
- [4] M. Takeuchi et al., *J. Phys. Chem. Lett.* 8, 5241(2017)



**Fig. 1.** (a) Raman spectra of HBSS at 25 to 45°C. (b) Difference Raman spectra of HBSS obtained by subtracting the spectra at 25°C from the spectrum at 30 to 45°C.



**Fig. 2.** Intensity ratios of O-H stretching Raman bands of HBSS (a) and of nucleus (b, red) and cytoplasm (b, green).



**Fig. 3.** The average temperatures of nucleus, cytoplasm, and buffer before (-) ( $n=14$ ) and after (+) ( $n=11$ ) DNP treatment. \* $P < 0.01$  Mean  $\pm$  SD.

## 細胞の中の水：分光計測と細胞内環境の理解

東北大院薬

○中林孝和

### Water in a Cell: Spectroscopic Measurements and Understanding of Intracellular Environments

○Takakazu Nakabayashi

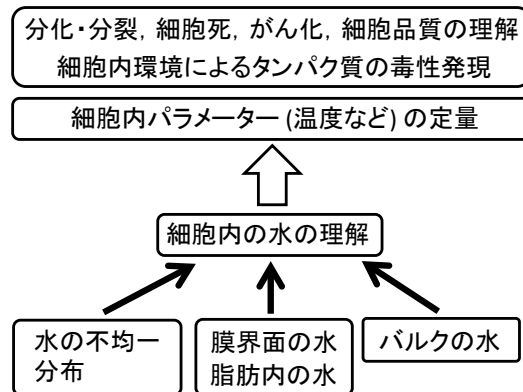
*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan*

**【Abstract】** We have shown our results on the direct observation of a spatial distribution of water molecules in a cell by Raman microscopy. We have obtained Raman images of a HeLa cell by plotting O–H stretching band region. The O–H Raman intensity of the nucleus was found to be higher than that of the cytoplasm, indicating that the water density in nucleus is higher than that in cytoplasm. The concentration of biomolecules was also estimated to be lower in the nucleus than that in the cytoplasm by analyzing the image of C–H stretching bands. These results indicate that the nucleus is less crowded with biomolecules than the cytoplasm. We have applied the detection of water molecules to the evaluation of intracellular environments and are convinced that Raman imaging in the O–H band region could be a powerful method for label-free investigation of intracellular environments.

**【序】** 私達は、分子分光学と生命科学とを組み合わせる研究を進めており、蛍光寿命イメージングなどの各種分光法を用いて刺激等に対する細胞内環境変化のその場計測を行っている[1,2]。本発表では、ラマンイメージングを用いた「細胞内の水」の話を中心に紹介する[3,4]。ラマンイメージングの細胞への応用は盛んに行われているが、私達はこのラマンイメージングを用いて細胞内の水を評価できることを提案したい。

近年、構造生物学の分野において、緩衝溶液内ではなく、生きた細胞内における生体分子の構造解析が注目を集めている。細胞内は分子クラウディングと呼ばれる生体分子で非常に混み合った状態であり、この混み合った状態は、細胞内での生体分子の構造と機能に影響を与えることがわかってきた。しかし、この細胞内の分子クラウディング自身については、実は全く分かっていない。分子クラウディングを理解する適切な物理量が無いために、オルガネラ間での分子クラウディングの差などは全くわかっていなかった。そこで私達は、「細胞内の水」に着目した。水の密度は生体分子の濃度を反映する量であり、水の密度が高ければ生体分子の濃度は小さいことになり、分子クラウディングの効果は小さく、水の密度が低ければ生体分子の濃度は高く、クラウディング効果は大きい。「細胞内の水の密度」が分子クラウディングの物理量となり、分子クラウディングの大きさを定量的に評価できると考えられる。

私達は、細胞内の水の O-H 伸縮振動のラマンバンドを画像化し、(1) 細胞質と核の水の密度の差の検出[4]を行い、さらに水の観測の応用として、(2) 脂肪滴内の水分子の検出[5]、さら



Scheme 1.

に、(3) 水のラマンバンドを用いた細胞内温度のラベルフリー計測[6]についても検討している。本発表では、細胞内の水の研究結果と今後の展望 (Scheme 1) について、タンパク質の毒性獲得[7,8]における細胞内環境依存性の結果も含めて紹介したい。

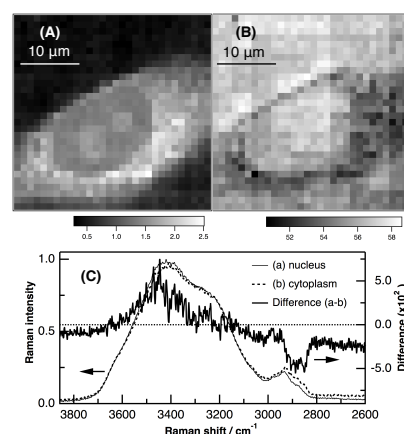
**【方法】**ラマンイメージングには多共焦点ラマン顕微鏡 (Phalanx-R, 東京インスツルメンツ) を用いた。励起光 (波長: 532 nm) を 10x10 点の格子点状に分割し、倒立顕微鏡に導入後、100 点のラマンスペクトルを同時に検出した。試料はヒト由来の細胞株である HeLa 細胞を用い、ガラスボトムディッシュ内に培養された状態で行った。

**【結果・考察】**細胞内水密度のオルガネラ依存性の結果を紹介する。Fig. 1A と B に単一 HeLa 細胞の C-H 伸縮振動および O-H 伸縮振動バンドのイメージングを示す。二つの画像で強度パターンが異なっており、C-H 伸縮画像では、細胞質の領域が核の領域よりもラマン強度が強いのにに対し、O-H 伸縮画像では、核の領域が細胞質の領域よりもラマン強度が強くなっている。この結果は、C-H 結合の濃度は核よりも細胞質の方が高く、一方、O-H 結合の濃度は細胞質よりも核の方が高いことを示している。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 Fig. 1C に示す。O-H 伸縮振動領域のブロードな正のピークと C-H 伸縮振動の負のピークが観測された。さらに、差スペクトルの O-H 伸縮振動のピーク位置が、核と細胞質の O-H 伸縮振動の位置とは異なり、核と細胞質でラマンバンドの形状が異なることがわかる。核の O-H 伸縮バンドの形状は周囲の培地の形状とほぼ一致したが、細胞質のバンドは培地とは異なり、低波数側の相対強度が増加した。この結果は、核は溶質の濃度が低いために、培地と同様のスペクトルを示すのに対し、細胞質内では生体分子の濃度が高く、生体分子の N-H および O-H 伸縮バンドが無視できないために、異なったスペクトル形状を示していると考えられる。

核と細胞質の O-H 伸縮振動バンドについて、生体分子の寄与を除き、積分強度と緩衝液の積分強度の比から核と細胞質の水の定量を行った。核と緩衝液では水の密度に差はほとんどなく、一方、核と細胞質の水の密度の差は約 3%であることがわかった。つまり、核は細胞質よりも水の密度が高く、生体分子の密度が低い、すなわち、核は細胞質よりも生体分子が混み合っていない (分子クラウディング効果が小さい) ことがわかった。核と細胞質において、バルクの粘性は細胞質の方が高く、誘電率は核の方が高い、また核内は細胞質内に比べて生体分子が動きやすいことを示している。

#### 【参考文献】

- [1] T. Nakabayashi, et al., Multi-Parametric Live Cell Microscopy of 3D Tissue Models (Springer), 121–133 (2017).
- [2] N. Ohta, T. Nakabayashi, Natural Biomarkers for Cellular Metabolism: Biology, Techniques, and Applications (CRC Press), 41-64, (2014).
- [3] S. Kajimoto, et al. Multi-Parametric Live Cell Microscopy of 3D Tissue Models (Springer), 163–172 (2017).
- [4] M. Takeuchi, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, *J. Phys. Chem. Lett.* **8**, 5241 (2017).
- [5] 柳美澤, 梶本, 炭谷, 中林, 第12回分子科学討論会, 3C14 (2018).
- [6] 杉村, 梶本, 中林, 第12回分子科学討論会, 3C11 (2018).
- [7] N. Fujimaki, T. Miura, T. Nakabayashi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 4468 (2016).
- [8] N. Fujimaki, K. Nishiya, T. Miura, T. Nakabayashi, *Chem. Phys.* **479**, 5 (2016).



**Fig. 1.** Raman images of a single HeLa cell in the C-H (A) and O-H (B) stretching band regions. (C) Difference Raman spectrum (solid line) of a single HeLa cell obtained by subtracting the spectrum of the cytoplasm ((b) dotted line) from the spectrum of the nucleus ((a) thin-solid line).<sup>4</sup>

## ラマンイメージングを用いた白色脂肪細胞内の H<sub>2</sub>O / D<sub>2</sub>O交換ダイナミクス

<sup>1</sup>東北大薬, <sup>2</sup>東北大院・薬

○柳美澤綾<sup>1</sup>, 梶本真司<sup>1,2</sup>, 炭谷双葉<sup>2</sup>, 中林孝和<sup>1,2</sup>

### Direct observation of H<sub>2</sub>O / D<sub>2</sub>O exchange dynamics in a white adipocyte

○Aya Yanamisawa<sup>1</sup>, Shinji Kajimoto<sup>1,2</sup>, Futaba Sumitani<sup>2</sup>, Takakazu Nakabayashi<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan

**【Abstract】** We have reported direct observation of exchange dynamics of H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O in a lipid droplet, an metabolism-related organelle, by Raman microscopy. A lipid droplet is composed of lipid esters and its Raman spectrum exhibits very strong C-H stretching bands due to lipids and weak bands in the O-H stretching band region due to other biomolecules and water. Immediately after the exchange of the culture medium of cells from H<sub>2</sub>O to D<sub>2</sub>O, O-D stretching Raman bands appeared and the intensities of broad O-H stretching Raman bands decreased and several Raman bands remained in the O-H stretching band region immediately after the exchange to D<sub>2</sub>O. Time-lapse measurements of the integrated intensity in the O-H stretching band region suggested that there are water molecules in a lipid droplet exchangeable slowly with extracellular water.

**【序】** 水は細胞内において極めて重要であり、必須かつ重要な構成要素である。しかし、生細胞内の水の状態は理解されておらず、オルガネラ間での水の量(密度)の差さえも不明であった。我々のグループでは、細胞内の水の理解にラマンイメージングが有効であると考え、生きた細胞内にある水の量を直接測ることに成功した。細胞内にある水のO-H伸縮振動のラマンバンドの積分強度から、核のほうが細胞質よりも水の密度が高いことを示し、バンド形状から細胞内の水の水素結合様式の情報も得ることができた。我々は、この研究成果から、「細胞内の水」が細胞を理解する新たなパラメータになり得ると考えている[1]。

そこで本研究では、細胞内の水の静的な不均一分布のみではなく、水分子の動的な分布変化および外部の水分子との移動ダイナミクスを明らかにし、細胞内の水について動的な側面から理解することを目的とする。細胞の培養液をH<sub>2</sub>O培地からD<sub>2</sub>O培地に変換することによって、細胞内ではO-H伸縮バンドの強度が減少し、O-D伸縮バンドの強度増加が観測される。このO-HまたはO-Dバンドのイメージングを行えば、細胞内部および細胞内外の水分子のダイナミクスを検討できると考えられる。我々は本手法を白色脂肪細胞に適用し、脂肪滴内には交換が遅い水分子があることを示唆する結果を得た。

**【方法(実験・理論)】** 測定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)または自作の共焦点ラマン顕微鏡を用いた。励起光源は両顕微鏡ともに532 nmである。試料はラット皮下白色脂肪組織由来の細胞株である白色脂肪細胞を用いた。観測の際には、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) を培地として使い、D<sub>2</sub>O培地として凍結乾燥したHBSSをD<sub>2</sub>Oによって溶解したものを準備した。培養したHBSSを顕微鏡上で取り除いた後、D<sub>2</sub>O培地に交換し、ラマン測定を行った。

## 【結果・考察】

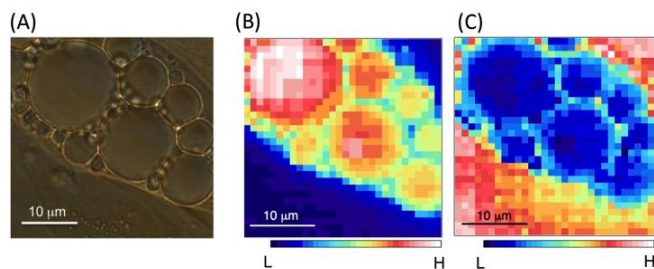
Fig.1 に脂肪細胞の明視野像 (A) とラマンイメージ (B: C-H 伸縮, C: O-H 伸縮) を示す. 白色脂肪細胞は脂肪滴が細胞内のほとんどを占める. 脂肪滴の主成分は脂質エステルであり, 脂肪滴部分ではC-H伸縮振動の強度は強く (Fig. 1B), O-H伸縮振動領域の強度は非常に弱く (Fig. 1C) 観測される.

脂肪滴部分の O-H 伸縮振動領域のラマンスペクトルを Fig. 2A に示す. (a, 赤) は  $D_2O$  に交換前のスペクトルであり, 水や生体分子の O-H および N-H 伸縮振動バンドが僅かに観測される. この細胞に対して, 培地を  $D_2O$  に交換すると, ブリードな O-H 伸縮振動の多くは消失し, 複数のバンドが主に観測される (b, 黒).  $3650\text{ cm}^{-1}$  の高波数域のバンドの波数は単量体の水分子[2]と一致するが, このバンドの帰属については更なる検討が必要である. 現在, 半乾燥状態の脂肪滴の赤外吸収スペクトルを測定し,  $3650\text{ cm}^{-1}$  のバンドの帰属を行っている.

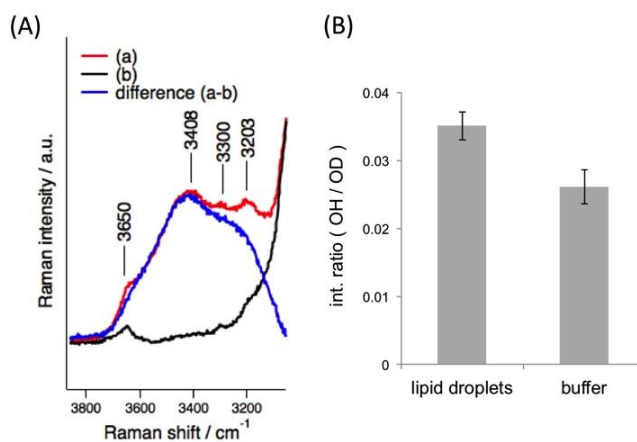
培地交換直後の脂肪細胞とその周辺のラマンスペクトルを取得し, O-H 伸縮と O-D 伸縮の面積強度比から残存する O-H 結合の濃度を検討した. 脂肪滴内部は, 交換直後に周囲培地と比べて O-H 結合が多く残存することがわかった (Fig. 2B). Fig. 3 は, 脂肪滴内の O-H 伸縮と O-D 伸縮の積分強度比を培地の積分強度比で規格化した値の時間依存性である. 18 分経過後も値は 1 以上であり, 培地に比べて O-H 結合は脂肪滴内に残存していることがわかる. 脂肪滴内の水の交換が遅いことを示唆している. 脂肪滴内の水分子の存在は, 加水分解によるエネルギーの産生など脂肪滴の生理機能・活性のマーカーとなる可能性がある.

## 【参考文献】

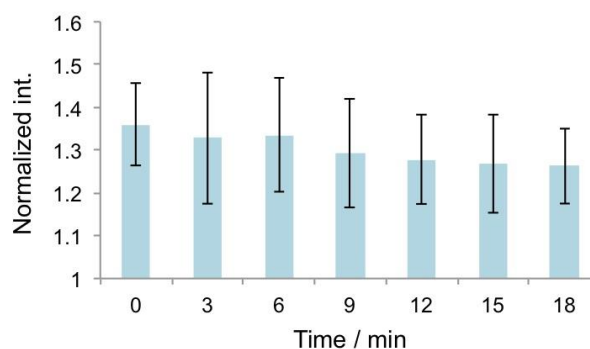
- [1] M. Takeuchi, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2017, **8**, 5241.
- [2] D. M. Carey, G. M. Korenowski, *J. Chem. Phys.*, 1998, **108**, 7.
- [3] R. Wolfenden, A. Radzicka, *Science*, 1994, **265**, 936.
- [4] N. J. Van Zee, et al., *Nature*, 2018, **558**, 100.



**Fig. 1.** A bright field image of a white adipocyte (A) and Raman images constructed by plotting the integrated intensity in the C-H stretching ( $2840\text{ cm}^{-1} \sim 2965\text{ cm}^{-1}$ ) (B) and O-H stretching ( $3200\text{ cm}^{-1} \sim 3680\text{ cm}^{-1}$ ) (C) band regions.



**Fig. 2.** (A) Raman spectra of a lipid droplet before (a) and after (b) the exchange to  $D_2O$  buffer, and its difference (c). (B) Integrated intensity ratio of O-H str. / O-D str. in lipid droplets and buffer.



**Fig. 3.** Time evolution of the integrated intensity ratio of O-H str. / O-D str. in lipid droplets normalized by the ratio of that in buffer medium.



## 糸状菌の顕微ラマン代謝イメージング

<sup>1</sup>関西学院大理工, <sup>2</sup>筑波大生命環境

○安田充<sup>1</sup>, 竹下典男<sup>2</sup>, 重藤真介<sup>1</sup>

### Microspectroscopic Raman Metabolic Imaging of a Filamentous Fungus

○Mitsuru Yasuda<sup>1</sup>, Norio Takeshita<sup>2</sup>, Shinsuke Shigeto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University, Japan

<sup>2</sup> Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Japan

**【Abstract】** A filamentous fungus grows by elongating the tip of the hypha. In order to investigate the elongation mechanism, a combined approach of Raman microspectroscopic imaging with stable isotope labeling is used in this work. A Raman band of a stable isotope-labeled compound usually shifts to the lower frequency side with respect to that of the unlabeled compound. By utilizing this characteristic, the localization of a stable isotope that is incorporated into various biomolecules via intracellular biosynthetic reactions, that is, the distribution of the metabolic activity can be visualized. In this study, we demonstrated microspectroscopic Raman metabolic imaging of a filamentous fungus using stable isotope (deuterium) labeling. When the filamentous fungus was cultivated in a liquid medium containing deuterium-labeled glucose, deuterium was found to be localized in the hyphal tip. This result suggests that the metabolic activity was significantly higher in the hyphal tip than the other region or that the deuterium-labeled glucose was incorporated selectively from the hyphal tip.

**【序】** 糸状の菌糸からなる糸状菌は菌糸の先端を伸長することで生長する。菌糸が伸びる仕組みを代謝の観点から調べるため、本研究では顕微ラマン分光法と安定同位体標識法を利用する。重い安定同位体で標識された化合物のラマンバンドは非標識化合物に比べて低波数側へ同位体シフトする。このラマンバンドの経時変化を追跡することで、安定同位体が細胞内の生合成反応により様々な生体分子に取り込まれた後、どこに局在しているのかを細胞を壊すことなく知ることができ、細胞の代謝活性を非破壊で評価できる [1]。本発表では、重水素で標識したグルコースを用いた糸状菌の顕微ラマン代謝イメージングについて報告する。

**【方法】** 糸状菌にはモデル生物として広く利用されている *Aspergillus nidulans* を使用した。また、安定同位体標識化合物として C-H 結合の水素 (H) をすべて重水素 (D) で置換したグルコース (以下、グルコース-D と記す) を使用した。最初に、安定同位体を含まない液体培地で糸状菌を 24–48 h、室温で培養した。つぎに、その液体培地を除去し、グルコース-D を含む液体培地を加えた。この培養期間中における糸状菌のタイムラプスラマンイメージングを、60x の水浸対物レンズを搭載した正立型顕微ラマン分光装置 (XploRA Nano, HORIBA) で行った。イメージング範囲は 14x20 点 (0.5 μm 間隔)、1 点あたりの露光時間は 1 sec、レーザー波長とレーザーパワーはそれぞれ 532 nm, 4.4 mW であった。

**【結果・考察】** 糸状菌のタイムラプスラマンイメージングの結果を Fig. 1 に示す。パネル A はグルコース-D を含む液体培地で培養したときの糸状菌の光学顕微鏡像である。白矢印で示した部分では培養 3.0 h 後に隔壁が観察された。この隔壁の形成により、糸状菌がイメージング測定の間も生きていたことが保証される。

パネル A の‘×’印で示した位置におけるラマンスペクトルをパネル B に示す。2150  $\text{cm}^{-1}$  付近に C-D 伸縮振動バンドが観測された。このバンドは~2940  $\text{cm}^{-1}$  付近の C-H 伸縮振動バンドが同位体シフトしたことによるものである。C-D 伸縮振動バンドの存在は糸状菌が細胞内にグルコース-D を取り込んだことを裏付ける。一方、黒矢印で示したシャープなバンドは共鳴ラマン効果によるシトクロム由来のバンドである。

つぎに、パネル A の菌糸先端部におけるマッピング像をパネル C に示す。各マッピング像はバンド強度より作成した。イメージ b では、C-H 結合を含む分子は培養初期の時点で菌糸先端の中央部に局在しているが、時間の経過に伴い、C-H 結合を含む分子が菌糸後方から先端に向かって移動しているように見える。これは生物学的な知見に基づくと、菌糸が伸びるために必要な生体物質が菌糸先端へ輸送されているためと考えられる。

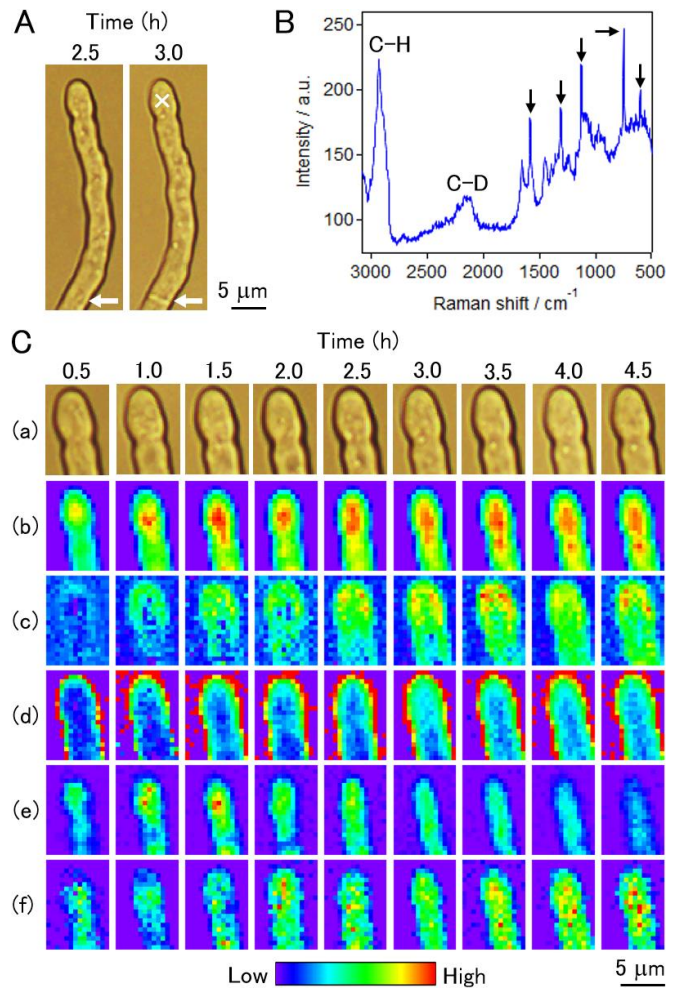
一方、イメージ c に示す安定同位体 D で置換された代謝産物の分布は、菌糸先端部で逆 U 字型の局在パターンを示している。またこの分布は時間の経過に伴って菌糸の後方部へと広がっている。これはグルコース-D が菌糸先端部から選択的に取り込まれた、あるいは菌糸先端部の代謝活性が後方部よりも高いことを示唆している。さらに、イメージ d より、C-H 結合に比べ、C-D 結合をもつ分子の相対量が時間とともに増大していることから、安定同位体 D が生合成反応により様々な生体分子へと取り込まれたことが示唆された。

以上より、糸状菌内の代謝活性を可視化する顕微ラマン分光法と安定同位体標識法との融合技術は、菌糸が伸びる仕組みを代謝の観点から明らかにする強力なツールとして利用できることが証明された。イメージ e の還元型シトクロム b/c (750  $\text{cm}^{-1}$ ) やタンパク質に由来するイメージング f のアミド I (1650  $\text{cm}^{-1}$ ) と菌糸伸長の関係については当日報告する。

**【謝辞】** 本研究は JST ERATO Grant Number JPMJER1502 (N. T. and S. S.) および光科学技術研究振興財団 (M. Y.) の支援のもと行われた。

### 【参考文献】

[1] H. N. N. Venkata and S. Shigeto, *Chem. Biol.* **19**, 1373 (2012).



**Fig. 1.** Time-lapse Raman imaging of *A. nidulans*. Panel A: optical images. Panel B: space-resolved Raman spectrum measured at point X in panel A. Panel C: Mapping images. (a) optical images, (b) C-H, (c) C-D, (d) C-D/(C-D+C-H), (e) reduced cytochrome b/c, and (f) amide I.

## クライオ蛍光顕微観察における界面屈折に由来する収差の 光学シミュレーションによる研究

東京工業大学 理学院 物理学系  
○石田啓太, 藤芳暁, 松下道雄

### Optical simulation of an aberration from interfacial refraction in cryogenic fluorescence microscopy

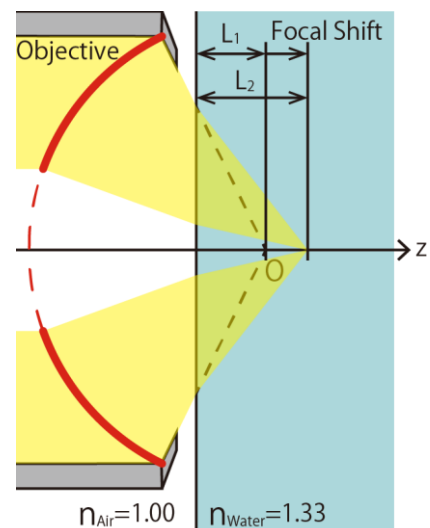
○Keita Ishida, Satoru Fujiyoshi, Michio Matsushita  
*Department of Physics, Tokyo Institute of Technology, Japan*

**【Abstract】** A main component in cells is water. When whole cells is observed by an optical microscope, the light will refract at an air/water (or oil/water) interface. Thus, an optical image of whole cells is often distorted and its resolution is deteriorated. Here we show optical simulation of the refraction effect of the focal spot at the inside of water. The simulation indicated that the interface refraction seriously affected to the optical image obtained by our reflecting microscope. The effect is remarkable in that the high numerical aperture of the objective ( $>0.6$  in dry) is used.

**【序】** 生命現象を理解するためには細胞を構成する分子同士の相互作用を知る必要がある。そのためには細胞内にある1個の分子をそのサイズの分解能でイメージできる顕微鏡が必要である。我々はその透過性と非破壊な性質から可視光を用いて、一分子測定が可能な蛍光顕微鏡の開発に取り組んでいる。顕微鏡の分解能は集光されてできるスポットの大きさで決まり、それは波動光学の計算により求められる。波動光学に基づき式変形のみで厳密に計算を行うには簡単な系であっても複雑な積分計算を要するため、現実の光学系に対しより簡単に適用できる計算方法が必要となる。そこで我々は Huygens-Fresnel の原理における波面を有限要素に分割し、各要素から輻射される素元波の重ねあわせを数値計算することでこれを実現した。

生体内部の顕微観察を行う際、多くの場合、試料表面には平らな界面が存在する。光線がこの界面で屈折することで、試料内部で画像が崩れ、分解能が低下することが指摘されている[1]。我々が扱っている系におけるこの影響を調べるために、Fig. 1.のように空気中から水中に光を集光させる光学シミュレーションを上記の計算方法により行った。講演では、作成した計算方法について報告し、光学シミュレーションの結果を示しながら顕微観察における界面屈折の影響とその対策について議論する。

解析する際に用いる記号について説明する。収差の無い理想的な反射対物鏡を用いて集光するとし、半開口角を  $\theta_{\max}$ 、半遮蔽角を  $\theta_{\min}$  とする。界面屈折がない場合に集光される点 O の界面からの深さを  $L_1$  とする。界面屈折がある場合に集光される点の深さを  $L_2$  とする。



**Fig. 1.** Layout of focusing inside of the air-water flat interface

【光学シミュレーション】収差の無い理想的なレンズは平面波を球面波に変換する。Huygens-Fresnel の原理によれば、波面上の各点からは素元波が発生している。球面波面上の強度分布と一致するように、素元波源として有限個の電気双極子を配置した。Fig.2. (a)では焦点を中心とした球面上に青色の点で双極子が配置されている。

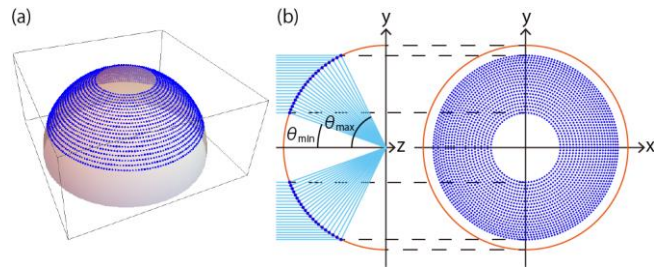


Fig. 2. Dipoles' coordinates

Fig.2. (b)は(a)の投影図であり、水色の線は遮蔽の存在する対物レンズにより集光される様子を表している。球面波面上で電場のノルムは  $\theta_{\min}$  から  $\theta_{\max}$  の範囲で  $\sqrt{\cos\theta}$  に比例する。(b)の  $yz$  断面において各双極子の間に入射する電場のノルムの総量が一定となるように複数の同心円を設け、そこに等間隔に双極子を配置した。この各双極子が輻射する光電場の重ね合わせから点像分布関数(PSF)を計算した。Fig.2.では見やすいように双極子の数を約 3,000 個としているが、実際の計算では約 35,000 個とした。構築した計算方法により空气中で集光する系の計算を行った結果、積分計算による結果[2]とよく一致することが確かめられた。

界面が存在する系では、各双極子から輻射される光電場が界面上で屈折されるとして同様の計算を行った。屈折の影響は輻射される光電場の経路に対し Fermat の原理(最小時間の原理)を用いることで取り入れた。

【結果】見かけの深さ  $L_1$  を  $5 \mu\text{m}$  として界面屈折の影響を調べた結果が Fig.3. である。対物レンズの開口角  $\sin\theta_{\max}$  は 0.9 とした。(A)が空气中、(C)が水中の PSF を等高線で表している。(B)(D)はそれぞれの PSF の光軸上の断面である。水中では PSF の形状が崩れ、光軸方向の半値全幅 FWHM は空气中的  $0.80 \mu\text{m}$  から  $2.01 \mu\text{m}$  に引き伸ばされ分解能が低下している。ピーク強度は空气中的の 8 割まで落ちている。また、水中で実際に集光される深さ  $L_2$  は  $8 \mu\text{m}$  となり、本来目的とした観察位置から移動している。これらの影響は界面から深くなるほど大きくなる。開口角を変化させ計算を行うと、界面屈折により像が崩れる影響は  $\sin\theta_{\max}=0.6$  を超える高開口数レンズを使用した場合で見られることが分かった。このことから高い分解能を得るために使用される大きな開口角を有する対物レンズが、必ずしも分解能をよくするわけではないという結論を得た。

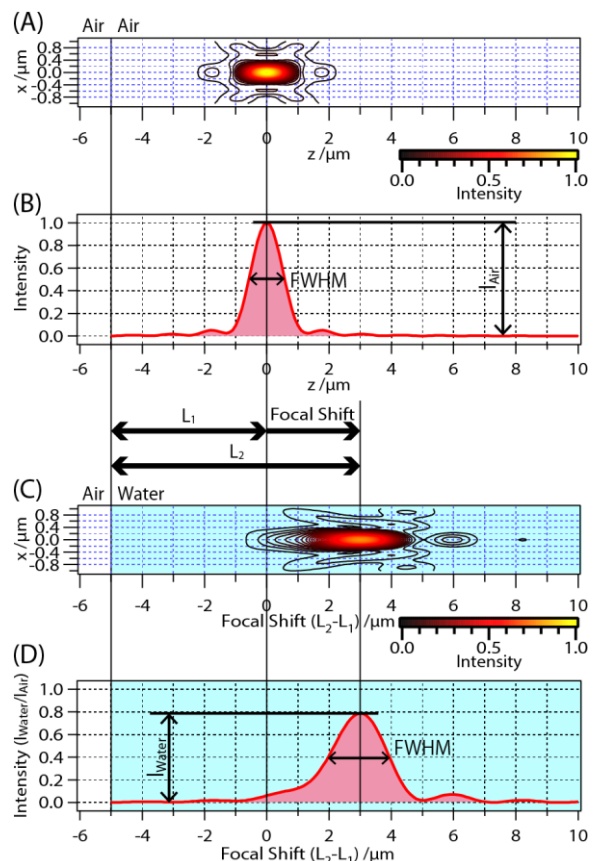


Fig. 3. PSFs in the air ( $n_{\text{Air}}=1.00$ ) and the water ( $n_{\text{water}}=1.33$ , the nominal focus depth  $L_1=5 \mu\text{m}$ ). The objective's NA is 0.90 ( $\theta_{\max} = 64^\circ$ ,  $\theta_{\min} = 20^\circ$ ). Light is 640 nm in wavelength and circular polarization.

### 【参考文献】

- [1] S. Hell et al. *Journal of Microscopy* Vol. 169, Pt 3, 391 (1993)
- [2] E. Wolf *Proc. Roy. Soc.* Vol.253, 349 (1959)

## クライオ蛍光顕微鏡による二本鎖DNAの 1分子光イメージング

東京工業大学 物理学系  
○古林琢, 石田啓太, 松下道雄, 藤芳暁

### Optical imaging of individual double stranded DNA using cryogenic fluorescence microscope

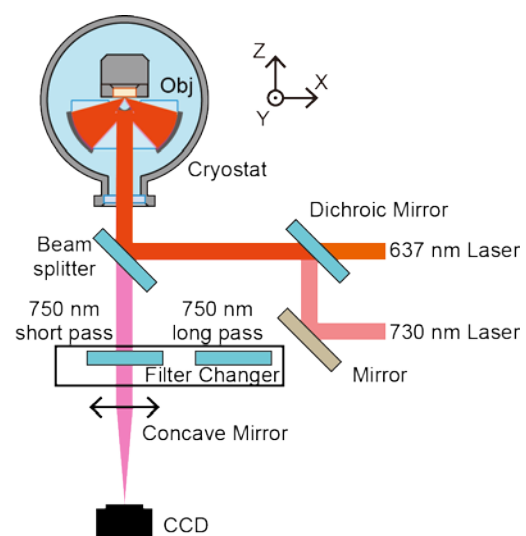
○Taku Furubayashi, Keita Ishida, Michio Matsushita, Satoru Fujiyoshi  
*Department of Physics, Tokyo Institute of Technology, Japan*

**【Abstract】** Molecular level imaging is important for on understanding of biological functions. However, such imaging has been challenging. Fluorescence microscopy has a potential for realizing the molecular level imaging. This microscopy is unique in its ability to visualize individual molecule in whole cells. However, the resolution is deteriorated to several tens of nanometers by experimental barriers. We have solved all the barriers by developing a cryogenic reflecting microscope. Recently, we visualized 5'- and 3'- ends of double stranded DNA by using spectrally distinct two dyes that emitted near-infrared fluorescence at 1.8 K.

**【序】** 生命現象の理解には、生体分子を分子レベルでイメージングすることが重要である。しかし、未だにそのような観測は行われていない。我々はこのような観測に向けて、細胞内の観察にユニークな優位点を持つ蛍光顕微鏡に注目している。蛍光顕微鏡の弱点は、分子の動きや蛍光色素の退色により、解像度が 20 – 50 nm に制限されている点である。そこで我々は極低温に試料を凍結させて固定化することで、これらの問題を解決した。その結果、1分子の蛍光色素の3次元位置をオングストローム精度で決定した[1]。最近、二本鎖 DNA の両末端の光イメージングに成功したので報告する。

**【実験】** 開発したクライオ蛍光顕微鏡の光学系を Fig.1 に示す。試料基板を反射型対物レンズと共にホルダーに固定し、クライオスタット内の超流動液体ヘリウム中で 1.8 K に凍結する。このような一体型の配置によって、機械的安定性をオングストロームレベルに向上させている。

試料には Fig.2A のような 30 塩基対の二本鎖 DNA の 5'-末端、3'-末端にそれぞれ近赤外蛍光色素 Alexa Fluor 750 (Ax750) と ATTO655 (AT655) を修飾したものを用いた。色素の吸収、蛍光スペクトルを Fig.2B に示した。この2種の色素を見分けるために2種類の励起光と光学フィルターをそれぞれ

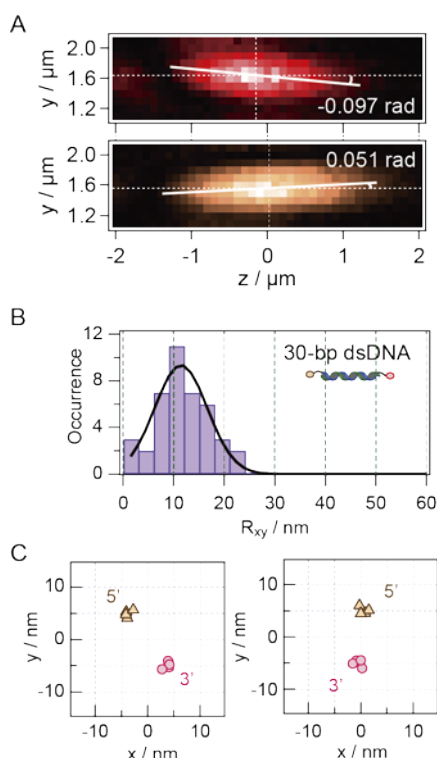


**Fig. 1.** Optical setup of the cryogenic reflecting fluorescence microscope. BS is beam splitter. 750 nm short pass filter and 750 nm long pass filter were selectable with the filter changer.

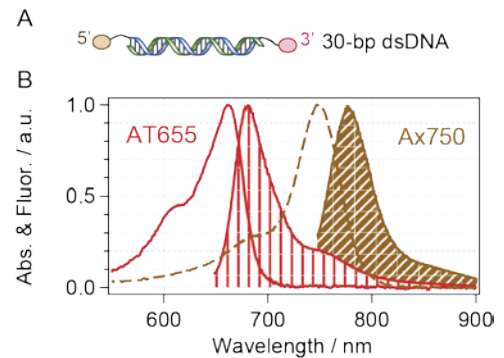
用意した。Ax750 は 730 nm レーザーで励起し、その蛍光を 750 nm ロングパスフィルターを通して、AT655 は 637 nm レーザーで励起し、その蛍光を 750 nm ショートパスフィルターを通して CCD カメラで検出する。これによって、回折限界内の 2 つの色素をスペクトル上で選択した。この際、サンプルを光軸方向にスキャンし、画像を取得することで各蛍光色素の 3 次元 PSF を取得した。取得した画像を解析することで、その色素間の相対位置を求め、イメージングした。

**【結果】** Fig.3A は共通の DNA に結合した 2 つの色素の蛍光による PSF である。色素によって PSF が光軸方向(z)に対し異なる方向に傾いていることが分かる。これは Fig.4 のように蛍光色素の遷移ダイポールが z 方向へ $\theta_{zx}$ 傾いているとき、PSF も $\phi_{zx}$ 傾く現象によるものと考えている。21 個の DNA に染色された色素を測定した結果、この 2 つの色素による PSF の傾きの差の標準偏差は 0.06 rad であった。共焦点系で測定した場合の z 軸の位置の不確定さは $\pm 500$  nm であったため、x, y 軸の位置決定に $\pm 30$  nm の系統誤差を与えていた。

ダイポール輻射に由来する系統誤差を抑えるため、3次元 PSF を取得し、z 軸の位置を標準偏差 25 nm の精度で求めた。このとき、x, y 軸の系統誤差は 1.5 nm となり、分子レベル光イメージングに十分な精度となった。このような系で 21 個の二本鎖 DNA の 5'-末端と 3'-末端の光イメージングを行った。



**Fig. 3.** (A) Experimental results for tilted PSF. (B) Histogram of the distance between the 5'- and 3'- ends. (C) Optical image of dual-labeled dsDNA at 1.8 K

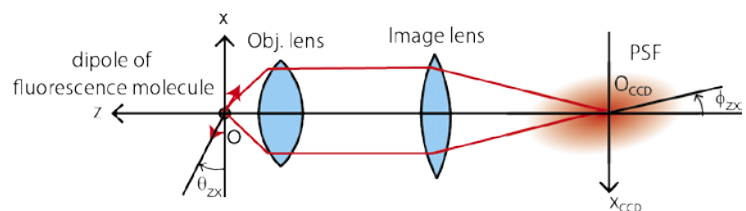


**Fig. 2.** (A) Structure of dual-labeled DNA. (B) Absorption and fluorescence spectra of AT655 and Ax750.

得られた DNA の長さのヒストグラムを Fig.3B に示す。この図から長さが  $10 \pm 5$  nm と求められた。30 塩基対の DNA の長さは 10.2 nm であり、この方法を用いると、両末端が光でイメージできていることが分かる。Fig.3C はイメージングの結果である。5'-末端と 3'-末端の位置を 4 回繰り返し測定した。5'-末端の測定結果を $\Delta$ で、3'-末端の測定結果を $\circ$ で表す。点のばらつきは測定精度を表しており、このイメージング法は真に分子レベルである。

#### 【参考文献】

[1] T. Furubayashi *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 8990 – 8994 (2017).



**Fig. 4.** Schematic diagram of a systematic error due to the dipole irradiation of an individual molecule.