

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

¹東北大薬, ²東北大院薬
○杉村俊紀¹, 梶本真司^{1,2}, 中林孝和^{1,2}

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

○Toshiki Sugimura¹, Shinji Kajimoto^{1,2}, Takakazu Nakabayashi^{1,2}

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan

² 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)

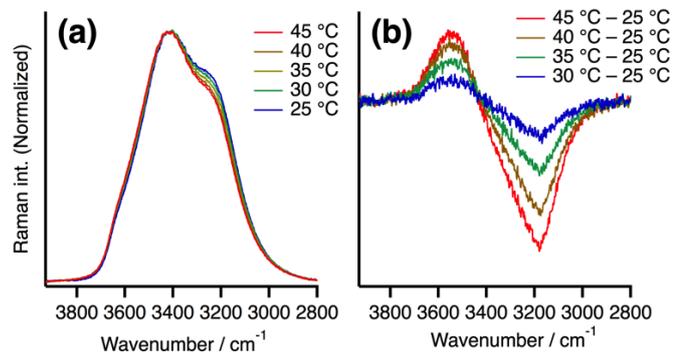


Fig. 1. (a) Raman spectra of HBSS at 25 to 45°C. (b) Difference Raman spectra of HBSS obtained by subtracting the spectra at 25°C from the spectrum at 30 to 45°C.

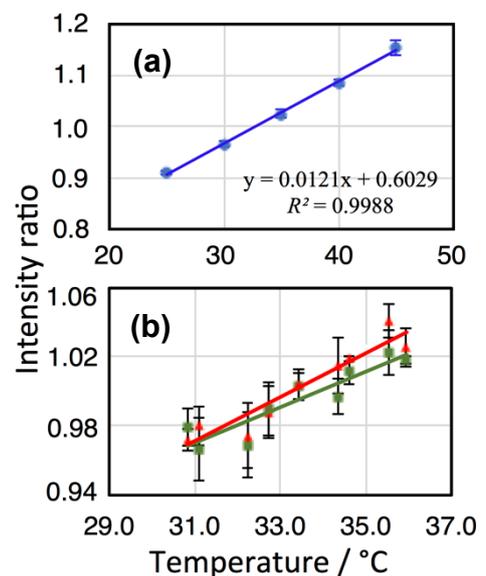


Fig. 2. Intensity ratios of O-H stretching Raman bands of HBSS (a) and of nucleus (b, red) and cytoplasm (b, green).

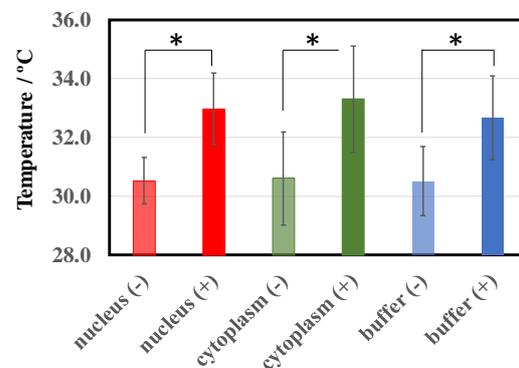


Fig. 3. The average temperatures of nucleus, cytoplasm, and buffer before (-) ($n=14$) and after (+) ($n=11$) DNP treatment. * $P < 0.01$ Mean \pm SD.