

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

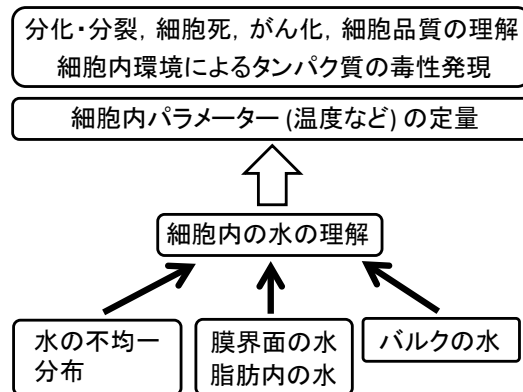
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan

【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).

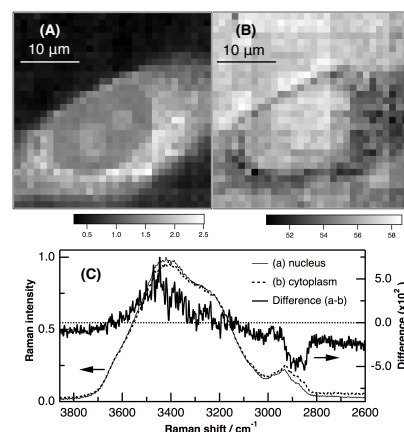


Fig. 1. Raman images of a single HeLa cell in the C-H (A) and O-H (B) stretching band regions. (C) Difference Raman spectrum (solid line) of a single HeLa cell obtained by subtracting the spectrum of the cytoplasm ((b) dotted line) from the spectrum of the nucleus ((a) thin-solid line).⁴