

ラマンイメージングを用いた白色脂肪細胞内の H₂O / D₂O交換ダイナミクス

¹東北大薬, ²東北大院・薬

○柳美澤綾¹, 梶本真司^{1,2}, 炭谷双葉², 中林孝和^{1,2}

Direct observation of H₂O / D₂O exchange dynamics in a white adipocyte

○Aya Yanamisawa¹, Shinji Kajimoto^{1,2}, Futaba Sumitani², Takakazu Nakabayashi^{1,2}

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan

² Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan

【Abstract】 We have reported direct observation of exchange dynamics of H₂O/D₂O 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 H₂O to D₂O, 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 D₂O. 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H₂O培地からD₂O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、D₂O培地として凍結乾燥したHBSSをD₂O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、D₂O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 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 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.

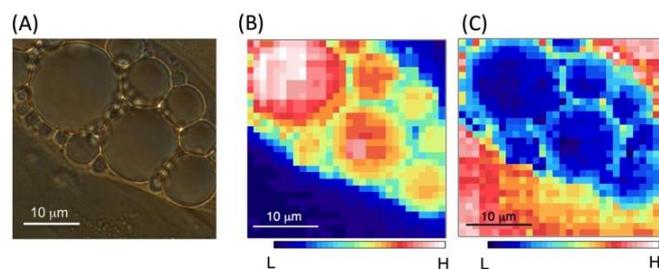


Fig. 1. A bright field image of a white adipocyte (A) and Raman images constructed by plotting the integrated intensity in the C-H stretching ($2840\text{ cm}^{-1} \sim 2965\text{ cm}^{-1}$) (B) and O-H stretching ($3200\text{ cm}^{-1} \sim 3680\text{ cm}^{-1}$) (C) band regions.

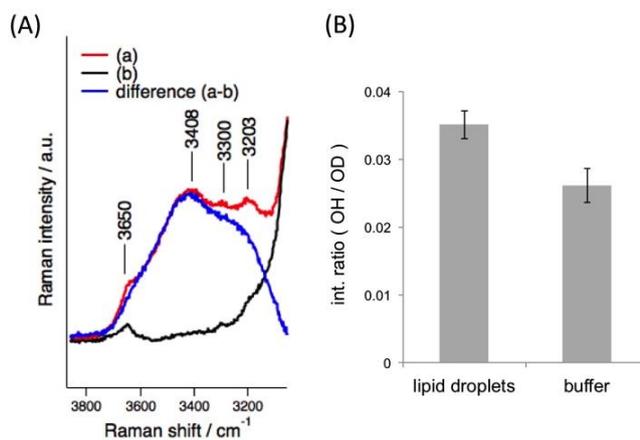


Fig. 2. (A) Raman spectra of a lipid droplet before (a) and after (b) the exchange to D_2O buffer, and its difference (c). (B) Integrated intensity ratio of O-H str. / O-D str. in lipid droplets and buffer.

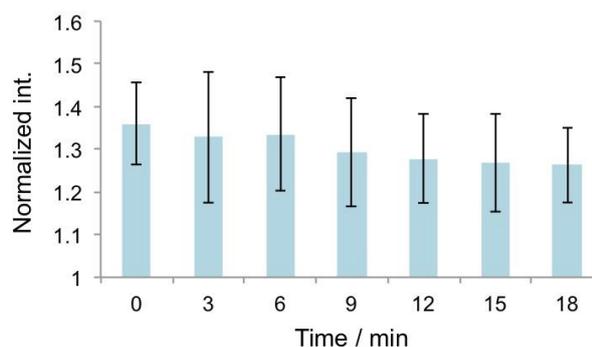


Fig. 3. Time evolution of the integrated intensity ratio of O-H str. / O-D str. in lipid droplets normalized by the ratio of that in buffer medium.