

ラマンイメージングを用いて生細胞内の水の密度を測定する

(東北大院薬)

○中林 孝和、竹内 瑞貴、梶本 真司

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、この分子クラウディング状態は、排除体積、誘電率の減少、水和の変化などの形で細胞内の生体分子の構造と機能に影響を与えることが知られている。また、タンパク質や生体分子の移動を介したシグナル伝達においても、分子クラウディングによって移動速度などが変化すると考えられる。細胞内分子の構造と機能に対する分子クラウディングの影響については、近年の In cell NMR の発展などにより、多くの知見が蓄積され始めている。しかし、分子クラウディング自身については、十分に理解されているとは言い難い。細胞内の分子クラウディングの検出方法として、蛍光プローブを用いた細胞内の粘性、拡散係数、蛍光スペクトルのピーク位置などの測定が行われている。しかし得られた結果が、巨視的な粘性、拡散係数の変化を反映しているのか、それとも蛍光プローブと生体分子との間の吸脱着を反映しているのかを区別することは難しく、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い。ラベルフリーで細胞内の分子クラウディング状態を観測する手法の開発が必要である。

本発表では、ラマンイメージングを用いて細胞内の水の観測を行い、核と細胞質における水の密度の直接比較に成功した結果について報告する。水の密度は生体分子の濃度を反映する量であり、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ている。実験は、ヒト由来の細胞株である HeLa 細胞を用い、水の O-H 伸縮振動のラマン強度をプロットすることで、細胞内の水の空間分布の測定を行った。次に O-H 伸縮振動バンドの積分強度から細胞内の水の定量を行い、スペクトル形状から細胞内の水素結合状態の違いについて検討した。

O-H 伸縮振動バンド強度と C-H 伸縮振動バンド強度のラマンイメージングの比較を行うと、その強度パターンが大きく異なることがわかった。特に、C-H イメージでは核の方が細胞質よりもラマン強度が小さいのに対して、O-H イメージでは反対に核の方が細胞質よりも強度が大きいという結果が得られた。この結果は、核は細胞質よりも水の濃度が高く、細胞質よりも生体分子が疎の状態であることを示唆している。実際に、核と細胞質の O-H 伸縮振動バンドについて、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うと、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差は 3%であることがわかった。さらに、核の O-H 伸縮振動バンドの形状は、緩衝溶液のバンド形状と同じであるのに対し、細胞質のスペクトル形状は、これらとは異なり、低波数側の相対強度が増加した形状であった。細胞質内での水の水素結合の変化、または生体分子の濃度が高く、N-H および O-H 伸縮振動バンドの強度が無視できないことが原因であると考えられる。分裂酵母においても HeLa 細胞と同様の結果を得ることができた。以上より、核の方が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、比較的疎であることが示された¹。

1. M. Takeuchi, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, submitted.