

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15225

研究課題名(和文)全反射顕微分光法で迫る生細胞の高圧下挙動

研究課題名(英文)High pressure study on a living cell using total reflection spectroscopy

研究代表者

黒井 邦巧(Kuroi, Kunisato)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：70757757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：深海生物の生存メカニズムを明らかにするためには、生命の最小単位である細胞の圧力下挙動を、その場測定で明らかにすることが手掛かりになると期待される。本研究では、細胞を圧力下で全反射ラマンや全反射蛍光などの顕微分光測定が可能な高圧光学セルの開発を行った。準備実験として、生体膜のモデルとなるリポソームを用いて、脂質の振動スペクトルへの圧力変化から高圧力による相転移を実際に観測可能であること、(2)高圧セル上で細胞を培養・観察し、圧力下で細胞形態は変化を受けないこと」を示すことができた。期間内に生細胞の全反射顕微分光測定には至らなかったが、本研究結果からその基礎となる成果を得ることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深海生物の高圧下での生存戦略を化学の視点から明らかにすることで、極限環境にも適用可能な有用な酵素や微生物などの開発につながることを期待される。そのために、本研究は生細胞の圧力挙動を明らかにすることを目指し、圧力下での測定1細胞の測定が可能な特殊高圧セルの開発と高圧セルを用いた予備的実験を行った。本研究結果は、極限環境生物を理解する上で必要となる生細胞の圧力下その場測定の基礎になると考えられる、

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the survival mechanism of deep-sea organisms, in-situ measurements of the behavior of single cell under high-pressure will provide a useful clues. In this study, we developed a high-pressure optical cell applicable to total-reflection microscopic raman or fluorescence spectroscopies. As a preliminary experiments, using liposomes which is often used as a model for cell membrabe, we showed that pressure effects on vibrational spectrum of lipid bilayers can actually provide information on its phase transition by pressure. Furthermore, we succeeded in culturing cells on a high-pressure cell and in observing them under high-pressure. The morphology of cells seemed not to be altered by pressure. Although we couldn't complete the project during the funding period, we established the basis for further in-situ high-pressure measurements.

研究分野：生物物理化学

キーワード：高圧 分光 細胞膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

数百気圧を超える深海や、100 近い温泉、高塩濃度における塩湖など、およそ人が生息不可能な極限的な環境にも多くの微生物が存在している。極限環境に生息する微生物が、どのような生存機構を持っているのかを明らかにすることは、生物の頑強性を理解する上で重要であり、これまで多くの研究が行われてきた。タンパク質分子などの生体分子への圧力効果の研究もその1つであり、高圧によるタンパク質構造の変化や、細胞膜のモデル脂質膜を用いた圧力による相状態の変化などの研究が行われてきている。

脂質膜は流動性の高い「液晶相」、流動性の低い「ゲル相」を持ち、生理的条件下では細胞膜は流動性の高い相にある。モデル脂質膜を用いた圧力効果の研究から、脂質膜は数百気圧で、流動性の失われたゲル相へと相転移する。深海の最深部であるマリアナ海溝では圧力が 1000 気圧に達することを考えると、深海環境では生物の細胞膜は相転移を起こしうることになる。しかし、生物の脂質膜が生理機能を発揮するためには、流動性の高い相として存在しなければならない。それでは、深海生物の細胞膜は高圧力下でどのように流動性を保ち機能しているのだろうか？これまで、深海微生物を用いた生化学的な研究から、深海生物は脂質膜の構成成分に不飽和脂肪酸の割合を増大させることで膜流動性を保つことが示唆されているが、圧力下での生細胞膜の振る舞いが、直接その場観測されたことはない。

高圧下のタンパク質についても、実際の細胞内での振る舞いについてはわかっていない。なぜなら、細胞内は緩衝溶液とは異なり、生体分子の濃度が高く、非常に混み合った分子クラウディング環境にあるからである。この分子クラウディング効果によって、生体分子の構造や機能も変化を受けることが知られている。したがって、細胞内にあるタンパク質の圧力効果も、緩衝溶液中とは異なることが予想されるが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

細胞への圧力効果をその場観測するためには、顕微鏡観察下で分析可能な高圧セルが求められる。本研究では、細胞の全反射蛍光・ラマン顕微分光などの分光計測が可能な高圧光学セルを開発し、高圧力下における細胞内の生細胞膜・タンパク質の相転移・構造変化などの観測を行うことを目的とした。全反射分光法では、光が全反射した際に界面に波長程度の深さに染み出す光、エバネッセント波を用いるために、界面に接着した細胞膜・膜タンパク質等の情報を選択的に得ることができる。全反射蛍光により、単一細胞の細胞膜中にある蛍光プローブ分子の拡散過程の観測から高圧力下の細胞膜の膜流動性の評価、および脂質膜の振動スペクトルから、高圧力下での膜の相状態や構成成分の変動、細胞内のタンパク質の構造変化などについて明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

高圧光学セル (DAC) の製作

高圧条件下で顕微分光測定 (顕微ラマン・蛍光相関分光) が可能なセルとして、ダイヤモンドアンビルセル (DAC) を用いることとした。DAC では、対面したダイヤモンドの切頂部分 (キュレット) の微小領域に、両側から力を加えることで高圧力を発生させることが可能なセルである。試料は、ガスカートと呼ばれる金属片の直径 1 mm 程度の穴内に封入され、両側からキュレットで挟み込まれる。キュレット上の試料は、ダイヤモンド面から侵入して全反射した励起光のエバネッセント波によって光励起される。

顕微測定を行うためには、DAC の試料部と対物レンズの距離 (ワーキングディスタンス = WD) は可能な限り小さく取る必要がある。一方、試料部からの光 (蛍光・ラマン散乱光) を得るために、開口角は可能な限り大きく取る必要がある。さらに、DAC のダイヤモンドの接頂部であるキュレット上で細胞を扱うため、キュレット径は可能な限り大きく取る必要がある。上記の3点の要請を満たす DAC として、英国の ALMAX 社の日本代理店である FIT リーディングテックスと協力しながら、設計・製作を行った。

人工脂質膜 (リポソーム) を用いた赤外分光を用いた試験的測定

本研究では、全反射ラマン分光を用いて、細胞膜の振動スペクトルから圧力下の構造情報を得ることを目的としていた。ここでは試験的な測定として、測定が容易な赤外分光法、および細胞膜のモデルとして POPC リポソームを用いて、圧力下での脂質膜の振動スペクトル挙動を事前に確認を行った。POPC リポソームは重水中で調製し、重水に懸濁させた状態で測定を行った。

圧力下での培養細胞の顕微観測

本研究では、DAC のダイヤモンド基板上に張り付いた生細胞の観測を行う。生細胞にはヒト子宮

頸がん細胞 (HeLa 細胞) を用いた。ダイヤモンド基板上での HeLa 細胞の生育は、DMEM 培地の細胞懸濁液 1 μL をキュレット上に置き、乾燥させないように水を張った 60 mm シャーレ上に DAC ごと置いて、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 パーセント CO_2 下で生育した。さらに、DAC 内の細胞を顕微鏡下で観測しながら、圧力効果による細胞の形態変化についての検討を行った。なお、顕微鏡下での測定には、長距離作動レンズ (LUCPLFLN20X, NA = 0.45, W.D. = 6.6-7.8 mm) を用いた。

4. 研究成果

高压光学セル (DAC)

Fig. 1(a) に製作した DAC を示す。(a) の上段は上からの写真であり、三角形の 1 辺は約 35 mm で中央にダイヤモンドの窓がある。3 つのスクリューを締め上げていくことで圧力を発生させる。下段は側面より見た写真であり、中央でダイヤモンドが正対している。製作した DAC は、WD = 5.5 mm、開口角 85 度、キュレット径 1.5 mm であり、広い開口角から対物レンズを可能な限り試料に近づけることが可能となった。(b) は圧力標準試料である BaSO_4 粉末を重水とともにキュレットに封入した写真である。外側の正六角形がキュレットで、内側の丸い領域がガスケットの穴内部である。穴内部に見えている黒い斑点が BaSO_4 粉末による物である。 BaSO_4 の先鋭な振動ピーク (約 982 cm^{-1}) は圧力とともに高波数シフトすることが知られており、これより発生圧力を推定可能である。スクリューをトルクドライバーで一定のトルクをかけながら締め上げることで、(c) に示すように発生圧力のコントロールを行った。2000 MPa 程度まで圧力が発生することを確認した。

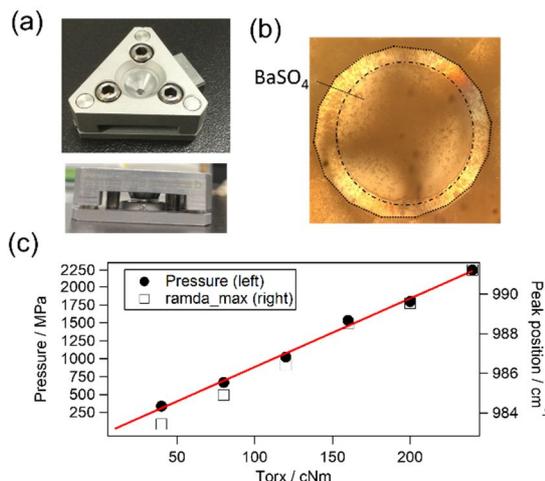


Fig. 1 (a) 製作した DAC の写真。(b) DAC のガスケット内部の写真。黒い斑点は BaSO_4 粉末である。(c) トルク (cNm) と発生圧力 (MPa) の関係。

人工脂質膜 (リポソーム) を用いた赤外分光を用いた試験的測定

Fig. 1(a) に POPC リポソームを重水中で測定した CH 伸縮振動領域の赤外スペクトルを、各圧力で示す。DAC 内圧力は同時に封入してある BaSO_4 粉末のピーク位置から推定した。高波数側に非対称伸縮 ($\sim 2923 \text{ cm}^{-1}$) の信号、対称伸縮 ($\sim 2852 \text{ cm}^{-1}$) の信号が明瞭に見えている。これらのピークは脂質のメチレン鎖 ($-\text{CH}_2$) のパッキング状態によって波数位置などが変わると言われており、それゆえ脂質膜 2 重層の相状態によって変化する。

どちらのバンドでも、800 MPa 付近までは、ピーク位置はあまり変わらないが、この点を超えると高波数シフトしていくことが分かる。強度についても同圧力点を境に増大から減少に転じていることが分かる。両ピーク位置について、圧力に対するプロットとして示した物が (b) の図である。また、両バンドの強度比を圧力に対して示した物が (c) の図である。両プロットから、500 MPa と 1000 MPa の間で、圧力への応答が変わっており、この圧力領域において POPC が相転移をしていることを示唆している。

POPC リポソームは、常温常圧では液晶相にあるが、常温では 100 MPa 以下でゲル相へと相転移することが知られている。ここで見られた 500-1000 MPa 付近での相転移はゲル相から別の相 (リップル相など) への相転移を示しているのかもしれない。

圧力下での培養細胞の顕微観測

Fig. 3(左) に DAC のキュレット上に張り付いた HeLa 細胞を示す。写真右上の稜線がダイヤモンドキュレットの輪郭である。観察倍率は 200 倍である。HeLa 細胞は増殖はしなかったが、2 日程度ならインキュベーター内環境でキュレット上で生存可能であった。ここに、慎重に金属ガスケット

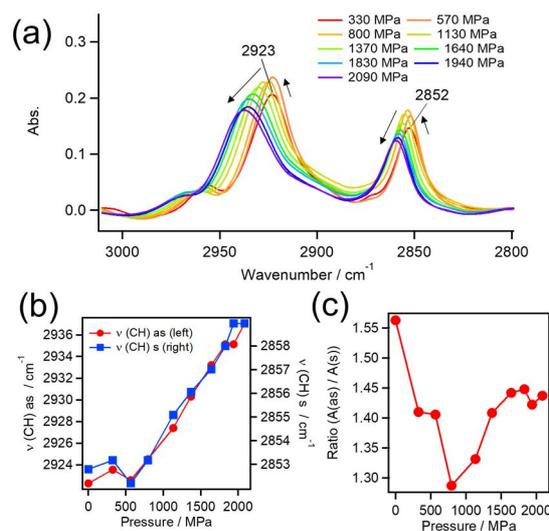


Fig. 2 (a) POPC リポソーム (重水中) における CH 伸縮振動領域の圧力挙動。(b) 非対称伸縮モード ($\sim 2922 \text{ cm}^{-1}$) と対称伸縮モード ($\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$) 波数の圧力依存性。それぞれ、左軸および右軸に示す。(c) 非対称伸縮モード強度 (A_{as}) と対称伸縮モード強度 (A_{s}) 比率の圧力依存性。

トを置いて封入した状態が、真中の「封入後」である。右上の黒い影が金属ガスケットの穴の輪郭である。ここに、200 cNm のトルクで圧力を加えた状態が写真右側である。Fig. 1(c)の検量線より、この時の発生圧力は 1700-2000 MPa 程度と推定される。封入後と加圧後で、同じ細胞を青矢印で示してある。これより、細胞の形態は加圧下でもほぼ影響を受けないことが示唆された。

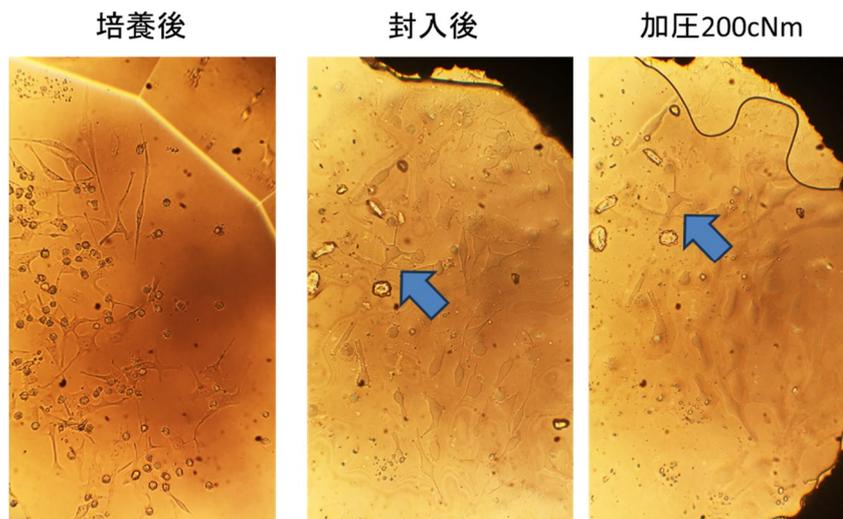


Fig. 3 (左)DAC のキュレット上でHeLa細胞を 10 時間程度、生育させた様子。(真中)HeLa 細胞をガスケットの穴内部に封入した様子。(右)200 cNm のトルク (1700-2000 MPa が発生) で加圧したところ。青い矢印は、加圧前後で同じ細胞を指しており、細胞の形態変化が認められないことを示す。

まとめと展望

本研究の期間内では、残念ながら予備的な検討で終わってしまったが、本研究で開発した DAC は顕微鏡下での測定でも実際に使えることが確認できた。また、DAC 上で HeLa 細胞を生きた状態で保持できたこと、人工脂質膜の振動スペクトル圧力挙動について示せたことで、生細胞の高圧下顕微分光測定を行う上での基礎が出来た。今後は、圧力下での細胞膜構造を明らかにするため、細胞膜に埋めた蛍光プローブの圧力下での蛍光相関分光 (FCS) 測定、他機関での協力を得ながらの顕微ラマン測定が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuroi Kunisato, Yamada Masaki, Kawamura Ibuki, Jung Minkyoo, Paek Chan-Gi, Fujii Fumihiko	4. 巻 24
2. 論文標題 FTIR study of the surface-ligand exchange reaction with glutathione on biocompatible rodshaped CdSe/CdS semiconductor nanocrystals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 13556-13364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d2cp00574c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒目恵里奈、三宮正大、黒井邦巧、藤井文彦
2. 発表標題 棒状半導体ナノ結晶表面におけるタンパク質コロナ形成の研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 所谷礼梨、瓦谷梨紗、黒井邦巧、藤井文彦
2. 発表標題 棒状半導体ナノ結晶を用いたナノマテリアルの形状依存的な細胞内取り込み評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川村芽、山田雅輝、黒井邦巧、藤井文彦
2. 発表標題 赤外分光法による親水性半導体ナノ結晶表面の配位子の分析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新有留茜, 黒目恵里奈, 黒井邦巧, 藤井文彦
2. 発表標題 サイズ別の球状・棒状ナノマテリアルの合成とタンパク質コロナ形成における ナノマテリアルの形状効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金澤勇太, 三宮正大, 黒井邦巧, 藤井文彦
2. 発表標題 タンパク質コロナ形成におけるナノマテリアルの形状効果とその熱力学的考察
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------