

SHG アッセイによる細胞膜の分子配向の乱れと回復の観察

Observation of perturbation and recovery of molecular orientation in plasma membranes by SHG assay

明大院理工¹, 明大理工² 小原千幸¹, 本田覇人², 原毅流¹, ◯加藤徳剛^{1,2}

Meiji Univ., Chiyuki Obara, Haruto Honda, Takeru Hara, ◯Noritaka Kato

E-mail: nkato@meiji.ac.jp

【背景・目的】非線形光学現象である第二次高調波発生(SHG)を用いて、細胞膜の脂質分子の配向の乱れを検出する SHG アッセイを開発した。ポリカチオンは静電吸着して、細胞膜を損傷することが、細胞から漏出する酵素を検出することで評価されてきた。このような方法では、損傷が検出されない低濃度域において、

Fig.1a から b のような細胞膜の脂質分子の配向の乱れや、ダイナミクスの変化を SHG アッセイで検出した[1,2]。そこで、細胞膜の分子配向が乱れた細胞が、その乱れを回復させる過程を SHG アッセイで観察し、膜構造修復機構を解明することを目的とした。

【方法】分子超分極率が大きい蛍光性両親媒性色素で細胞膜を染色し、波長 850nm でパルス幅約 100fs の励起光を用いて、SHG 像と二光子励起蛍光(TPF)像を撮像した。それぞれの 3D 像の積分強度(I_{SHG} , I_{TPF})の比(I_{SHG}/I_{TPF})が、低いほど分子配向が乱れていると評価した。カチオン性のトランスフェクション剤である直鎖型ポリエチレンイミン(PEI)を添加した FBS 不含培地を HeLa 細胞に 1h 曝して膜構造を乱した後、増殖培地(5% FBS)に入れ替え、SHG アッセイを行った。なお、アッセイを行う時点で細胞膜を染色して、SHG 像と TPF 像を撮像し、 I_{SHG}/I_{TPF} 値を求めた。

【結果】1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の直鎖型 PEI に 1h 曝すと、 I_{SHG}/I_{TPF} 値は 1.02 から 0.56 に低下した。SHG 像から、その強度が低下している (Fig.2a, b)ため、分子配向が乱れていることが分かる。その後、増殖培地に入れ替え、18h 培養したら I_{SHG}/I_{TPF} 値が 1.07 まで上昇し、SHG 像からもその強度が回復していることが分かる (Fig.2c)。従って、乱れた膜構造が回復することが分かった。直鎖型 PEI の他に、分岐型 PEI や膜透過性ペプチドであるアルギニン 10 量体により乱された細胞膜構造の回復についても評価して、それぞれの違いについて議論する。

[1] N. Kato, Biophysical Reviews 11 (2019) 399-408.

[2] E. Aiyama, N. Kato, J. Phys. Chem. B 128 (2024) 1680-1688.

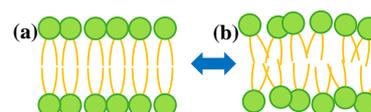


Fig. 1 (a) Ordered and (b) disordered structure in the plasma membrane.

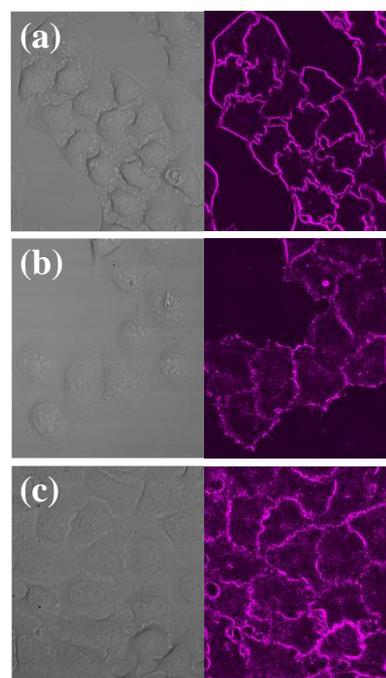


Fig. 2 Bright field and SHG images of the HeLa cells (a) before and (b) after the 1h-exposure of the linear PEI containing medium to the cells. (c) Bright field and SHG images of the cells cultured in the growth medium for 18h after perturbing their membranes by the 1h-exposure of the linear PEI.