深紫外共鳴ラマン分光を利用した細胞内分子イメージング

熊本康昭^{1,2}, 田口敦清¹, 河田聡^{1,2}

1近接場ナノフォトニクス研究チーム,2理研阪大ナノフォトニクス共同研究室

深紫外ラマン分光顕微鏡を開発して、細胞内分子イメージングを行なった。これまで、細胞の顕 微ラマンイメージングは多数報告されているが、いずれも可視光、あるいは近赤外光を使用した ものであり、深紫外光を用いた細胞の顕微ラマンイメージングは、我々の報告が初めてである。

深紫外光を用いて細胞をラマン観察すると、細胞内の核酸塩基と芳香族アミノ酸が選択的に見 える。この選択性は、ラマン散乱の共鳴効果に起因する。すなわち、深紫外光のフォトンエネル ギーは、核酸塩基や芳香族アミノ酸の電子遷移エネルギーと同程度であるために、エネルギー共 鳴によって、これらの分子からのラマン散乱の効率が増大する。可視光や近赤外光を用いた場合、 共鳴効果はないので、核酸塩基や芳香族アミノ酸を感度よく観察することは困難である。

図1(a)は、開発した装置で測定した細胞の顕微ラマンスペクトルである。スペクトルには、 核酸塩基(アデニンとグアニン)、芳香族アミノ酸(トリプトファンとチロシン)が選択的に観 察されている。核酸塩基に帰属される1490cm⁻¹のバンドの強度分布で細胞の画像を構築すると、 図2(b)に示す結果が得られた。図2(c)に示す透過光画像との比較から、深紫外ラマン画像が細 胞核と細胞質に特徴的な分布を示していることがわかる。細胞核内に強調されているスポット (矢印ののい)は、核小体によるものと考えられる。核小体は、タンパク質が合成される場所であ り、タンパク質合成のために、DNA と RNA が高密度で存在する。一方、細胞質の分布は、全体的 に均一であり、細胞質にある RNA に起因しているものと考えられる。細胞質には、DNA はほとん ど存在しない。

図1(a)に示すスペクトルでは、1340cm⁻¹にも核酸塩基に帰属されるバンドが見られる。このバ ンドは、1490cm⁻¹のバンドとは異なる強度分布を示す。図1とは別の細胞を用いたイメージング の結果を図2に示す。図2(a)の1340cm⁻¹の強度分布では、細胞核が強調されている。この分布 は、細胞核内に局在しているDNAの分布の特徴を示している。一方、図2(b)の1490cm⁻¹の強度分 布では、細胞核と細胞質が同程度に強調されており、DNAとRNAの両方の分布を示しているもの と考えられる。以上のことから、1490cm⁻¹と1340cm⁻¹の強度の比で画像を構築すると、図2(c)の ように細胞質が強調されており、RNAの分布を示しているものと推測される。本結果は、深紫外 ラマン分光が、DNAとRNAの分布の識別にも利用可能であることを示唆している。

本成果の実現は、特別仕様の深紫外ラマン顕微鏡の開発と測定方法の工夫によるところが大き い。概要は、通常のステージ走査型共焦点レーザーラマン顕微鏡と同様であるが、細胞内生体分 子からの深紫外ラマン散乱を効率よく検出するために、可視・近赤外用のラマン顕微鏡とは異な る仕様である。光学素子のガラス材料には、合成石英またはフッ化カルシウムを用いた。これら の材料は、深紫外光を高効率で透過させる。また、複屈折性を有しないので、透過光学系の材料 として適している。光源には、CW発振アルゴンイオンレーザーのSHGを用いた。分光器には、焦 点距離 500mm、刻線密度 1800G/mm の回折格子を用いた。長い焦点距離、大きい刻線密度のお陰で、 深紫外域でも十分な波数分解能を得られる。検出器には、深紫外域で最大 70%の量子効率を有す る紫外用背面照射型 CCD カメラを用いた。また、紫外光による試料分子の劣化を抑えるために、 シャッターと ND フィルターを入射系に導入した。シャッターの導入により、試料が余分に紫外 照射されなくなる。ND フィルターを用いることで、試料への照射強度を最適化した。イメージン グ測定では、試料台をピエゾコントローラで二次元に走査した。走査のステップは、試料面にお ける集光スポットの直径(~120nm)よりも大きく(=500nm)して、試料の光劣化の蓄積が、スペク トル測定に影響しないように配慮した。高い解像度を得られるように、高 NA の対物レンズを用 いた。また、紫外光による細胞の変形を小さく抑えるために、細胞は測定に先立って乾燥固定し た。乾燥固定を行なった場合、パラホルムアルデヒドを用いて液中で固定した場合とは異なり、 観察中に細胞が顕著に変形することは無かった。

今後、さらに光学系の改良を行ない、試料の分子劣化を減らすことを目指す。分子の劣化を減 らすことで、空間分解能の向上、生理環境下で固定された細胞の深紫外ラマンイメージングへと つなげていく計画である。また、近接場顕微鏡技術と融合させて、近接場深紫外ラマン顕微鏡の 開発も進める予定である。

参考文献

Y. Kumamoto, A. Taguchi, N.I. Smith, and S. Kawata. "Deep UV Resonant Raman Spectroscopy for Photodamage Characterization in Cells," *Biomedical Optics Express* 2, 4, 927–936 (2011).

Y. Kumamoto, A. Taguchi, N.I. Smith, and S. Kawata. "Deep ultraviolet resonant Raman imaging of a cell," Journal of Biomedical Optics 17, 7, 076001 (2012).



図1.(a)細胞の深紫外ラマンスペクトル、(b)(a)に見られる1490cm⁻¹の強度分布、(c)透過光画像。



図2. 細胞の深紫外ラマン観察における (a) 1340cm⁻¹、(b) 1490cm⁻¹の強度分布。(c) (b)/(a)。