

2P117

直接ラマン分光イメージング装置を用いた生細胞の動的観察 (東大院理) ○中塚岳、濱口宏夫

【序】 顕微ラマン分光法は生細胞に対する物理化学的研究手法として有用である。その特徴として、単一生細胞の *in vivo* 測定が可能であること、細胞内の物質分布や構造に関する情報が分子レベルで得られること、染色などの前処理が不必要なことなどが挙げられる。また、当研究室はこれまでに、生きた酵母細胞のミトコンドリアのラマンスペクトルには代謝活性を反映する「生命のラマン分光指標」が現れることを発見しており、顕微ラマン分光法が他の手法では得がたい情報を与えることが示されている。

顕微ラマン分光法の中でも、物質分布やそのダイナミクスに関する情報を得ようとするときに、ラマンイメージングは非常に有用である。ある振動モードでラマンイメージングを行うことで、その振動モードを持つ分子の分布を可視化することができる。これまで、ラマンイメージングはそのほとんどが共焦点ラマン顕微鏡を用いたスキャン方式によって行われてきた。しかしながら、この方法ではサンプル全体をスキャンしてひとつのラマンイメージを得るのに数分から数十分程度の測定時間を必要とする。生細胞内の物質変化を追跡するには測定時間の短縮が求められる。また、スキャンすることでサンプル中の場所によって測定時刻にずれが生じ、実際のダイナミクスを正確に反映したイメージを得ることは難しい。そこで、我々は高速かつ観察したい領域全体を同時にラマンイメージングできる装置を開発し、生細胞の動的観察を行うことを目指した。

【実験】 図1に本装置の原理を示した。ビーム径を広げたレーザー光を対物レンズ後で平行光となるように顕微鏡に導入し、サンプル位置で広い領域に照射する。サンプル各点からのラマン散乱光は、バンドパスフィルターで特定の波長だけが透過し、直接 CCD 検出器に結像する。つまり、分光器を用いずにバンドパスフィルターによって分光し、レーザーとバンドパスフィルターの波長の差に相当するラマンシフトでの直接ラマンイメージを得る。

図2には装置の概略図を示す。励起光源として波長可変な色素レーザーを用い、レーザー光をピンホールによって空間フィルタリングした後に、ビーム径を広げて顕微鏡に導入する。サンプルから出るラマン散乱光は、バンドパスフィルターおよびレーザー散乱光除去用のロングパスフィルターを通して選別され、CCD 検出器に結像する。

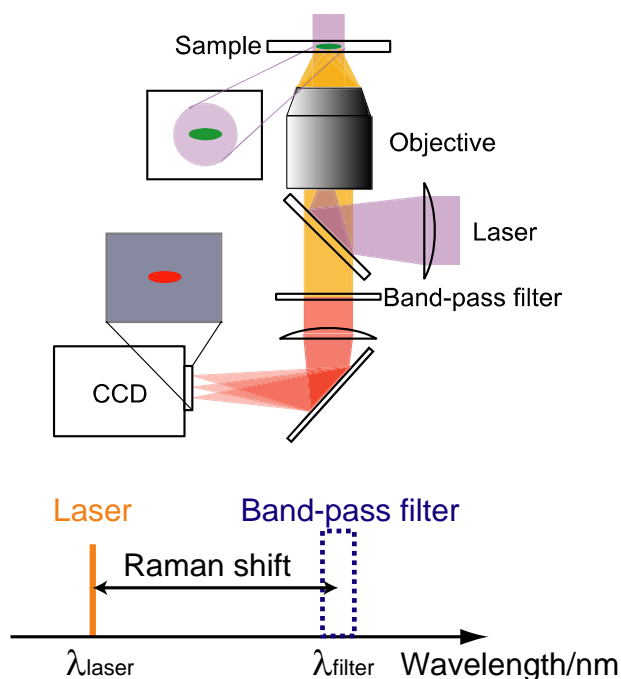


図1 直接ラマン分光イメージングの原理

バンドパスフィルターを固定し、色素レーザーの波長を変化させることで、様々なラマンシフトにおけるイメージを得ることができる。本要旨の実験結果は、色素レーザーの発振波長を 649 nm、バンドパスフィルターを 800 nm 中心とし、透過してくるラマン散乱光が約 2900 cm^{-1} に対応するよ

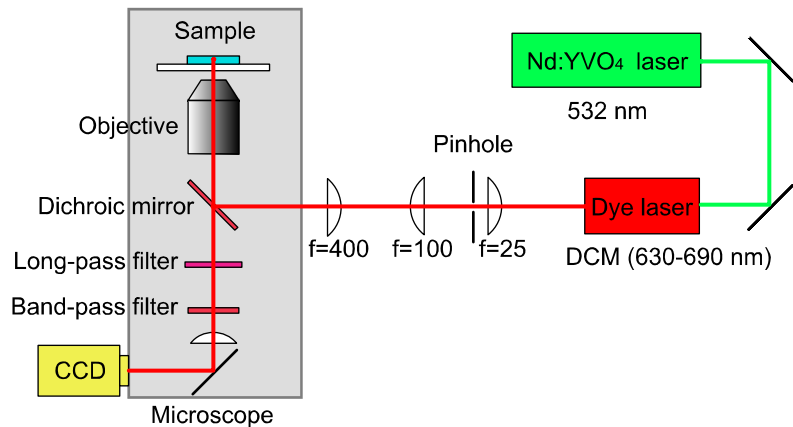


図 2 直接ラマン分光イメージング装置

うにした。これはサンプルとして用いた分裂酵母細胞 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) 中のタンパク質、脂質、糖類などに含まれる C-H 結合の伸縮モードのピークが現れる領域である。分裂酵母細胞は自家蛍光の少ない石英ガラスボトムディッシュ上に固定して測定し、分裂前後のラマンイメージを得た。サンプル位置でのレーザーパワーは約 25 mW で、測定時間はひとつのイメージあたり 10 秒間であった。

【結果】 得られた分裂酵母細胞のイメージを図 3 に示す。(a) は分裂前の酵母の光学像 (上) およびラマンイメージ (下) であり、(b) は分裂後の酵母の光学像 (上) およびラマンイメージ (下) である。分裂前後での酵母のラマンイメージがよいコントラストで得られた。この例のように、直接ラマンイメージング法は細胞のダイナミクスを追跡することに適した手法であることが示された。

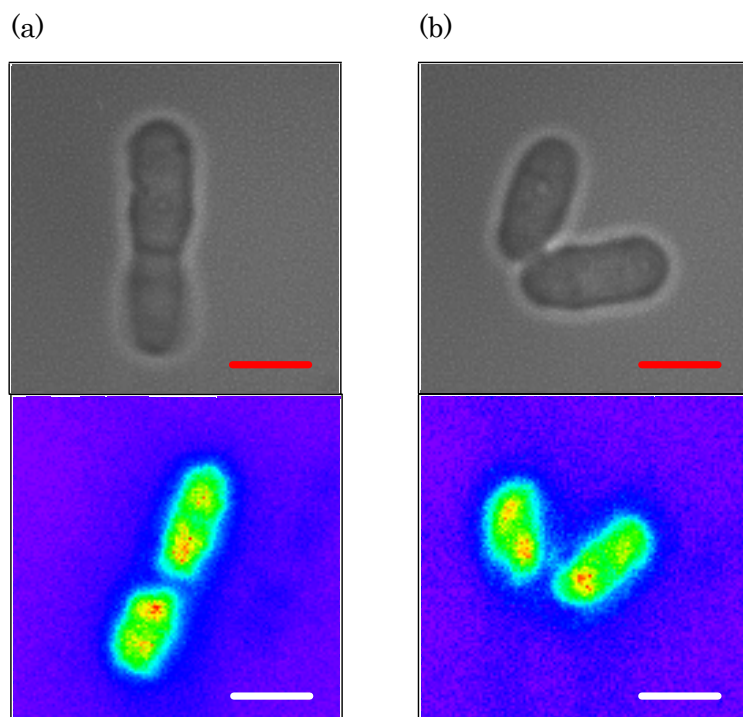


図 3
(a) 分裂前
(b) 分裂後
スケールバー: $5\mu\text{m}$