

3P051

2 波長ピコ秒赤外超解像顕微鏡法を用いた培養細胞の赤外イメージング

(東工大資源研¹、防衛医大²)

○植原健¹、井上圭一¹、小暮聡¹、酒井誠¹、大森努²、石原美弥²、菊地眞²、藤井正明¹

【序】赤外分光法は分子の構造や環境を鋭敏に反映する。一方、赤外光の波長の長さの長さを反映して回折限界が大きいため、空間分解能が低く、細胞などの微小領域を測定する顕微分光には原理的に適さない。そこで我々は、細胞の観察に赤外分光法を応用するために 2 波長ピコ秒赤外超解像顕微鏡法を開発した。この顕微鏡法では、過渡蛍光検出赤外分光法をレーザー蛍光顕微鏡へ応用することによって細胞の測定が達成される。過渡蛍光検出赤外分光法は、第 1 の赤外レーザー光によって特定の振動に赤外励起した分子のみを第 2 の可視レーザー光により選択的に電子励起し、その結果生じる S_1 状態からの蛍光 (過渡蛍光) を検出する分光法である (図 1)。この方法では赤外吸収によって得られる分子振動に関する情報を、可視蛍光に変換して観測できる。可視光の回折限界は赤外光より遙かに小さいので、この方法を顕微鏡に融合することで赤外イメージングを可視の空間分解能で行うことが可能となる。つまり、赤外超解像を達成した過渡蛍光像の観測を行うことができる。また、赤外レーザーに対する可視レーザーの照射のタイミングを変えることで、通常のレーザー蛍光顕微鏡では不可能であった振動緩和ダイナミクスの観測も可能となる。

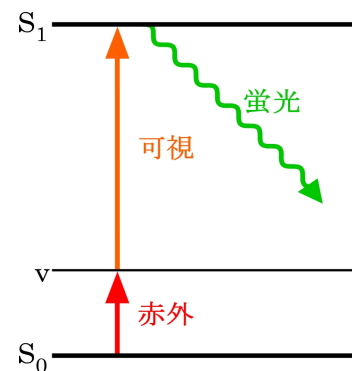


図 1: 過渡蛍光検出赤外分光法

これまで我々はこの顕微鏡法を蛍光色素で染色した細胞に適用し、赤外イメージングと蛍光色素の振動緩和ダイナミクスの観測に成功した。細胞全体を染色するローダミン 6G のほか、核のみを染色する SYTO24、細胞膜のみを染色する DiO18 などの色素を用いて、細胞内の部位によって振動緩和ダイナミクスが異なるかどうかを検証し、核などの親水性部位では振動エネルギーの散逸が遅く、細胞膜などの疎水性部位では散逸が速いことを明らかにした。

しかし、これらは細胞を染色している蛍光色素の赤外吸収および振動緩和に関する結果であり、細胞自身の振動情報を直接観察しているものではない。もし、細胞を構成する分子や細胞の代謝に関わる分子の赤外イメージングや振動緩和ダイナミクスの観測ができれば、細胞の構造や活動に関する情報をより直接的に得られることが期待される。多くの細胞ではミトコンドリアでの好氣的エネルギー代謝に伴い、フラビンの比較的強い自家蛍光を観察できることが知られている。本研究では、培養したヒト肺癌由来の A549 やヒト卵巣癌由来の SHIN3 などの自家蛍光性の細胞を対象に、赤外イメージングと振動緩和ダイナミクスの観測を赤外超解像顕微鏡で行い、生きた細胞の構造や活動についてより深い知見を得ることを目指した。

【実験】可視と赤外 2 色のピコ秒レーザー光は正立型顕微鏡の下側から同軸で入射し、焦点距離 100 mm の CaF_2 レンズでそれぞれ 100 μm ϕ 、90 μm ϕ 程度の大きさに集光し試料部全面へ照射した。発生した蛍光を $NA = 0.5$ の対物レンズを用いて上側から集め、レンズで ICCD へ結像した (図 2)。フラビンの吸収極大が 450 nm 付近にあることから、可視光に 560 nm を用い、赤外光

の波長は $3\ \mu\text{m}$ 帯に合わせた。また、通常の蛍光観察を行う場合は $488\ \text{nm}$ の可視光を用いた。細胞はスライドガラスまたはカバーガラス上に培養し、培地を充填してカバーガラスで閉じ、プレパラート化した。

【結果】 図 3 に A549 の透過像と蛍光像および過渡蛍光像を示した。(a) は透過像である。(b) は $488\ \text{nm}$ のレーザーを照射した蛍光像であり、細胞の中央部から蛍光が強く得られている。(c) は $3030\ \text{cm}^{-1}$ の赤外光と $560\ \text{nm}$ の可視光で観察した過渡蛍光像であり、細胞の縁の部分から強い蛍光が得られている。(c) で用いた赤外光は、フラビンのイソアロキサジン環の赤外吸収に波長を合わせたので、(c) はフラビンの赤外吸収を反映した像であると考えられる。(b) と (c) は分布が異なるが、これは、(b) では細胞や培地に含まれるフラビン以外の蛍光物質も $488\ \text{nm}$ で励起し蛍光を観測している一方、(c) では赤外光でフラビンを選択的に励起し、その細胞内における分布が反映されているためであると考えられる。(d) と (e) は赤外光を $2900\ \text{cm}^{-1}$ と $2600\ \text{cm}^{-1}$ に変えて観察した過渡蛍光像である。フラビンの赤外吸収がある $2900\ \text{cm}^{-1}$ を用いた (d) では強い蛍光が得られているが、フラビンの赤外吸収がない $2600\ \text{cm}^{-1}$ を用いた (e) では蛍光がほぼ消失しており、フラビンの赤外吸収によく対応している。さらに、(c) と (d) を比較すると、(c) では細胞の縁全体から蛍光が得られているが、(d) では細胞の縁の左側だけから蛍光が得られている。これは、蛍光を発しているフラビンの種類（例えばフラビンモノヌクレオチドとフラビンアデニンジヌクレオチドなど）が異なり、それぞれの波長における赤外吸収が異なることに起因することが考えられる。講演では、この点について議論するほか、他の細胞での結果、さらには振動緩和ダイナミクスについても報告する予定である。

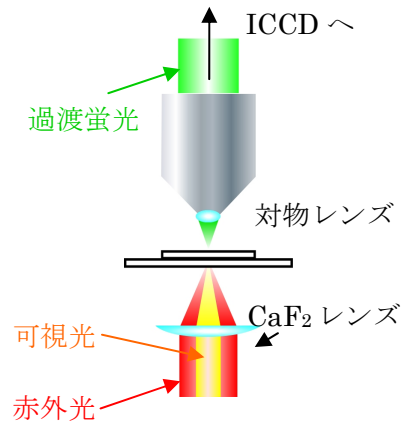


図 2: 赤外超解像顕微鏡の集光系

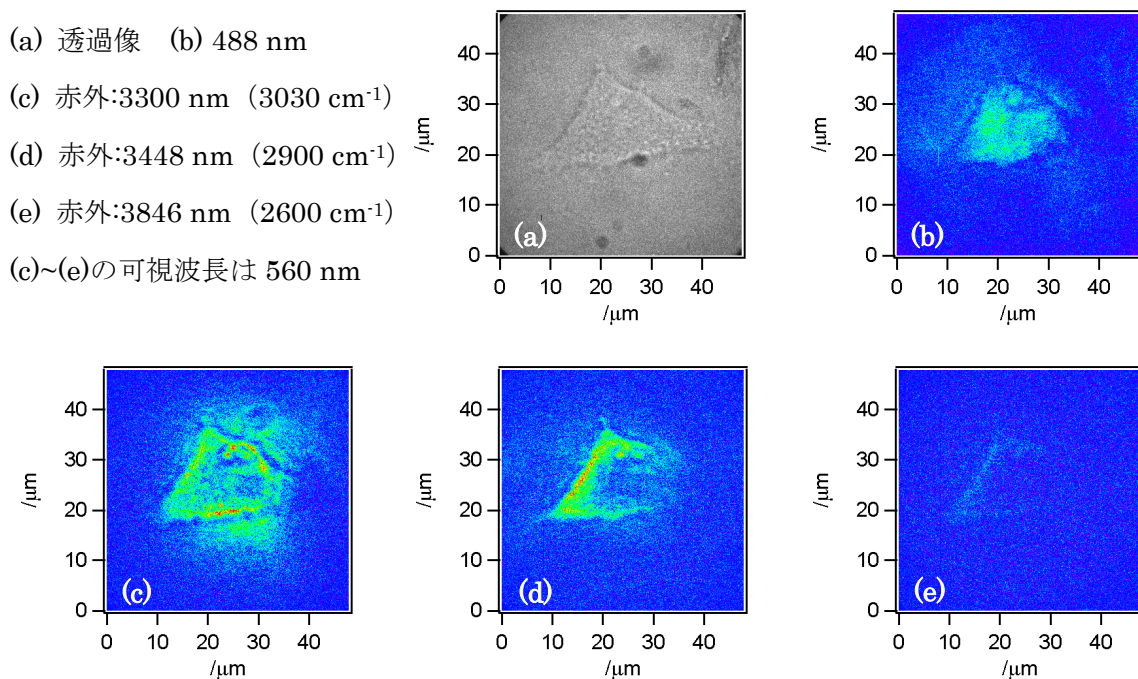


図 3 : A549 の透過像と蛍光像および過渡蛍光像