

振動和周波 (VSFG) 赤外超解像顕微鏡の開発と 細胞内構造の赤外分光イメージング

(東工大資源研) ○井上 圭一、小暮 聡、菊地 克也、藤井 正明、酒井 誠

【序】赤外分光法は分子振動スペクトルを測定することで、対象とする分子の構造およびその分子が置かれた環境に対する数多くの情報を得ることができ、これまで数多くの研究がなされてきた。その中で、近年生細胞やナノ空間など微小領域における分子の振動情報に対する興味が強く持たれている。しかし、赤外光は可視光と比べて回折限界が大きく、現状の赤外顕微鏡では波長と同程度（数～数十 μm ）の空間分解能しか得ることが出来ない。従って例えば生体試料の場合、組織レベルでしか観察が行えず、従来の可視光を用いた顕微鏡法と比べて応用が遅れている。

これに対して、我々はこれまで2波長レーザー分光法的一种である過渡蛍光検出赤外分光法 (TFD-IR 法) をレーザー蛍光顕微鏡に応用した、赤外超解像顕微鏡の開発を行ってきた。この方法では赤外励起された分子のみからの可視蛍光を観察するため、可視光の分解能で赤外吸収に関する情報を得ることができる。この手法を用いて我々は蛍光色素で染色された細胞に対し、赤外光の回折限界より優れた空間分解能で細胞の赤外像を得ることに成功した (1, 2)。しかし TFD-IR 法は蛍光性の試料にしか適用できず、大部分が蛍光を發さない生体分子の振動情報を得ることは困難である。そこで今回我々は蛍光検出ではなく新たに振動和周波 (VSFG) 光検出に着目した非蛍光生分子にも適用可能な赤外超解像顕微鏡の開発を行った。

細胞の膜表面など非対称な環境にある分子やキラルな対称性を持った分子に、赤外光と可視光が入射すると2つの振動数を足したものに相当する VSFG 光が発生する。この VSFG 光の強度は赤外光の波長が分子の振動モードに一致したときに著しく増大する。従って細胞からの VSFG 光を観察することで細胞の赤外像を得ることができ、さらに VSFG 光が可視光の波長を持っていることから、その空間分解能は赤外光の回折限界より小さくなり、赤外超解像を達成することが可能である。またそれぞれの赤外波長における強度を測定することで、細胞中の分子に対する赤外スペクトルを得ることができる。

【実験】励起光源である赤外光と可視光は再生増幅器によって増幅された Ti:Sapphire レーザーのピコ秒パルスで波長変換することで得られ、それぞれの波長が 2500-3800 nm ($2631\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) および 610 nm の光を用いた、強度を $7\text{ }\mu\text{J/pulse}$ および 100 nJ/pulse とした。そしてこれらの光をビームコンバイナーによって同軸化し、 CaF_2 レンズ ($f = 100$) を用いて、サンプル上に照射した。発光は背面から対物レンズ (N. A. = 0.5) を用いて集め、ノッチフィルターおよびバンドパスフィルター、赤外カットフィルターを通した後、結像レン

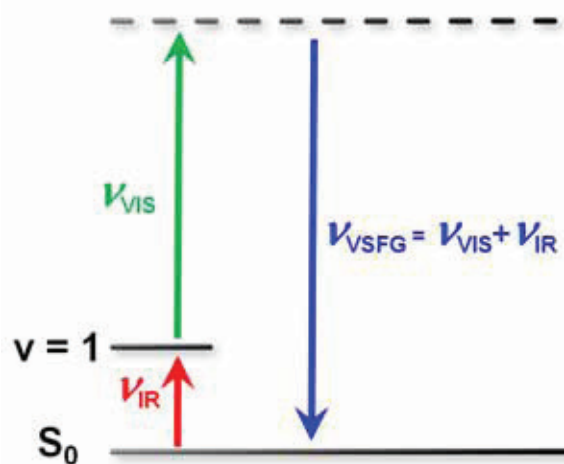


図1 振動和周波発生
のエネルギーダイアグラム

ズにより ICCD カメラ上に結像した。試料にはタマネギ根毛細胞を用い、塩酸処理後薄片化し、プレパラートに封入した。

【結果と考察】図 2(a)に測定に用いたタマネギの根毛細胞の透過像を示す。ここに可視光 (610 nm) および赤外光 (3470 nm (2880 cm^{-1})) を同時に入射すると図 2(b)のように細胞全体から強い VSFG 光が得られた。図 2(b)から見積もられる VSFG 光の分解能はおよそ $1.1\text{ }\mu\text{m}$ 以下であり、これは赤外光の回折限界 ($3.4\text{ }\mu\text{m}$) より小さく、VSFG 法を用いたことで赤外超解像が達成されたことが示された。さらに赤外光の波長を変化させたときの、細胞中の各点(i) - (iv)における VSFG 信号の強度をプロットしたところ図 2(c)のようになった。このうち(i)、(ii)は異なる細胞の細胞質部分のものであり、 $2830\text{-}3040\text{ cm}^{-1}$ の領域に他の部位と比べて強い信号が見られた。この赤外波長はアルキル鎖に結合した-C-H 結合の伸縮振動に相当し、細胞膜中の脂質分子や細胞膜中の糖分子の吸収を反映したものであると考えられる。また2つのスペクトルが似通っていることは、異なる細胞であっても同じ細胞質部分での化学的な組成は同様のものであることを意味しており、それが VSFG 法を用いることで判別可能であることを示している。これに対し(c)の核壁や(d)の核小体部分ではより高波数の $3055\text{-}3130\text{ cm}^{-1}$ の領域における信号が強く現れるが、これは芳香環のもつ-C-H 結合の伸縮振動に対応し、核中に多く存在する核酸塩基や核タンパク質の芳香族性アミノ酸によるものであると結論した。

今回の結果は VSFG 赤外超解像顕微鏡を用いることで細胞自身を構成する生体分子の赤外超解像を得ることが可能であることを示したものであり、さらなる生物学的・医学的応用を期待させるものである。講演では赤外スペクトルについてのさらに詳しい説明と考察を行う予定である。

(1) M. Sakai *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* (2007) **439**, 171-176.

(2) M. Sakai *et al.*, *Chem. Lett.* (2007) **36**, 1380-1381.

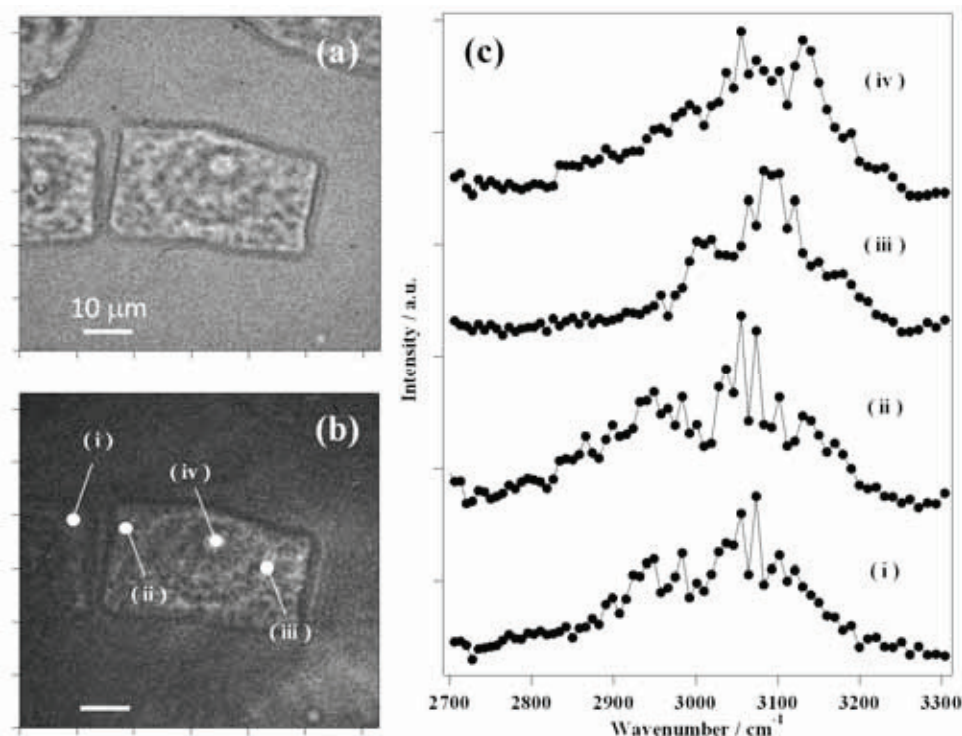


図 2 タマネギ根毛細胞の(a)透過像および(b)VSFG 像、(c)細胞中の(i), (ii)細胞質、(iii)核壁、(iv)核小体における赤外スペクトル