

## 2B11 温度数ケルビンのタンパク質 1 分子分光装置の機械的安定性の評価

東工大 物理 日野原 拓也・濱田 裕紀・松下 道雄・○藤芳 暁

生体試料の観察において、Far-field 蛍光顕微鏡は、非接触で、試料の厚さ方向を含む 3 次元情報が得られ、かつ一分子レベルの感度を持つ強力な方法である。しかし、光の回折現象のために、分子やタンパク質の大きさに比べて、1~2 桁空間分解能が低いという原理的な制約がある。例えば、1 個の分子が発する波長  $\lambda$  の蛍光を、理想的な蛍光顕微鏡で観測した場合、得られる蛍光画像は、図 1A の赤線のようなエアリー関数となる。原点 ( $x = 0$ ) から見て、初めて強度がゼロになる距離  $r_{1st}$  は第 1 暗環半径と呼ばれ、 $r_{1st} = 0.61 \lambda \text{ NA}^{-1} \text{ M}$  で表される (NA: 対物レンズの開口数、M: 顕微鏡の倍率)。レイリーの定義では (図 1A)、二つの分子からの蛍光像の距離  $r_{AB}$  が  $r_{1st}$  に一致する場合 ( $r_{AB} = r_{1st}$ ) が、それぞれの像が分離して見える限界であるとし、これを空間分解能としている。よって、試料位置では M を割り算した距離  $r_{1st,obj} = 0.61 \lambda \text{ NA}^{-1}$  がこれに対応する。NA の限界値は  $\sim 1.5$  であり、 $\lambda = 0.50 \mu\text{m}$  とすると、 $r_{1st,obj} \sim 0.20 \mu\text{m}$  となる。また、図 1B に示したスパローの定義 ( $r_{AB} = 0.78 r_{1st}$ ) では、 $r_{1st,obj} \sim 0.16 \mu\text{m}$  となる。この分解能  $r_{1st,obj}$  は、分子やタンパク質の大きさに比べて、1~2 桁大きい。

2 分子間の距離で定義される空間分解能に対して、蛍光像の位置決定の精度は光子数ゆらぎで決まり、光子数の平方根に比例して精度が向上する[1]。もし、二つの分子を別々に蛍光させることが出来れば、スパロー限界はもとより、 $r_{AB} = 0.1 r_{1st}$  の条件 (図 1C) でも、それぞれの位置の違いを蛍光イメージから求めることができる。

このような 1 分子の位置決定は、1995 年に T. Schmidt らによって実験的に示された。彼らは、室温下 (300 K) で、色素 1 分子の位置を 30 nm ( $r_{AB} \sim 0.1 r_{1st}$  の条件) の精度で決定した[2]。現在では、顕微鏡の機械的ドリフトを補正することで、分子の大きさと同程度 ( $< 1 \text{ nm}$ ,  $r_{AB} < 0.01 r_{1st}$  の条件) の精度で色素 1 分子の位置を決定できる方法や[3]、STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) という光学課程を用いて、回折限界よりも近接した複数の分子の位置を  $< 10 \text{ nm}$  の精度で決定する方法[4]が開発されている。一方、2002 年、Matsushita らは、温度数ケルビンでは、回折限界内にある数百個の分子の位置を数 nm の精度で決定した上で、それぞれの分子のスペクトルと配向を 1 分子ごとに取得できることを報告している[5, 6]。

室温、低温を問わず、これらの実験の成功の鍵は、対物レンズと試料との相対位置のゆれを、目的とする精度よりも高くすることにかかっている。しかし、一般に、蛍光顕微鏡の機械的安定性は回折限界 (数百 nm) を基準として設計される場合が多く、決定したい位置精度とは 1 桁以上の開きがある。そこで、我々はポリスチレンビーズの位置決定を用いて、蛍光顕微鏡の機械的安定性を  $\pm 0.1 \text{ nm}$  の精度で定量的に決定できる光学系を作製した。その結果、温度 1.5 K の 1 分子蛍光顕微鏡の機械的ゆれが、15 分にわたり  $\pm 1 \text{ nm}$  に抑制できることを実験的に確かめたので報告する。

【検査光学系の概要】 図 2A に、作製した光学系を示す。超流動ヘリウム恒温槽はこれまで数ケルビンのタンパク質 1 分子分光に用いてきたものである[7 - 9]。これは、文献 5,6 で用いたものとほぼ同一の設計で作成したものであり、機械的な安定性も同程度であると考えられる。試料と対物レンズ (反射型、焦点距離  $f = 2 \text{ mm}$  [10]、 $\text{NA} = 0.6$ ) は超流動ヘリウム中に配置した。試料には、直径 100 nm のポリスチレンビーズをスピコートしたガラス基板を用いた。コートの際に、面密度を  $10^{-3} \mu\text{m}^{-2}$  に調整することで、個々のビーズの画像を分離して観測出来る条件にした。試料の後方からレーザー光 (633 nm) を集光し、ビーズからの散乱光を対物レンズで集め、 $f = 200 \text{ mm}$  の結像レンズで CMOS カメラ (ARTCAM-130MI-BW、フレームレート:  $> 15 \text{ fps}$ 、画素サイズ:  $5.2 \mu\text{m} \times 5.2 \mu\text{m}$ ) に結像させた。この結像レンズと CMOS カメラはアルミで一体成形したホルダーに固定し、特に、CMOS カメラはエポキシ樹脂で接着することで、結像レンズと CMOS カメラの相対位置の変化を  $\pm 10 \text{ nm}$  に抑えた。図 2A の光学系は倍率 100 倍の光学顕微鏡になっている。このため、結像レンズと CMOS カメラの機械的ドリフトが  $\pm 10 \text{ nm}$  であれば、試料位置での機械安定性の検査精度が  $\pm 0.1 \text{ nm}$  となる。

図 2B に、図 2A の顕微鏡で得られたビーズの散乱光イメージを示す。原点にあるのが、1 個のビーズからの散乱光である。図 2A のような配置では、ビーズで散乱されたレーザー光

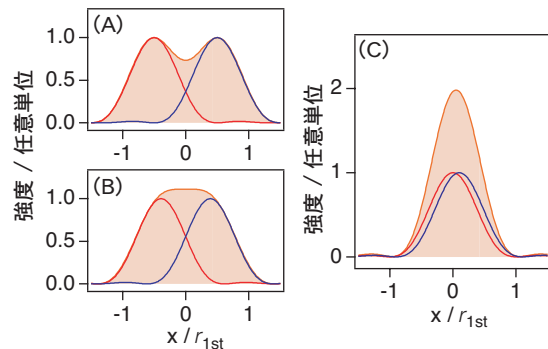


図1. 二つの分子からの蛍光像. 赤と青の実線がそれぞれの分子からの蛍光像、橙で塗りつぶした実線が実際に観測されるそれぞれの和の蛍光像である. (A) レイリー限界:  $r_{AB} = r_{1st}$  (B) スパロー限界:  $r_{AB} = 0.78 r_{1st}$ , (C)  $r_{AB} = 0.1 r_{1st}$ .

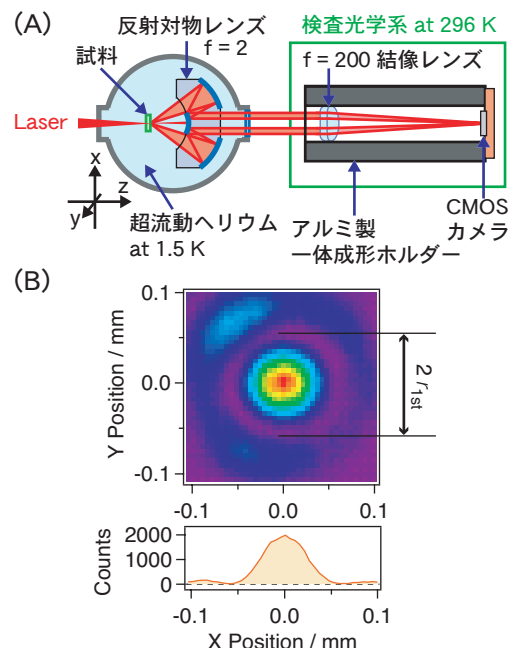


図2. 光学系の模式図. (A) 1.5 K のタンパク質 1 分子測定装置の機械的ドリフトの検査の配置. X 軸は定盤に対して水平方向、Y 軸は鉛直方向とする. (B) CMOS カメラで観測されたビーズの散乱光像.

は反射対物レンズの小さい球面鏡で遮蔽されるために観測されない。このため、得られる散乱像は図 2B のような暗視野の画像となる[10]。解析では、直径  $2r_{1st} = 0.11$  mm の円（第一暗環）の中の信号のみを用いて 1 次のモーメントを求め、これをビーズ散乱像の位置  $(x, y)$  とした。試料基板とビーズとの相対位置は数ケルビン下であるため、固定されている。よって、光学系で検出されるビーズ散乱像の動きは、試料と対物レンズとの相対位置の変化によるものと考えられる。

【検査光学系の安定度の評価】 低温での光学顕微鏡の検査を行う前に、検査光学系（図 2A、緑の枠内）の安定度を定量的に検査した。検査には、理想的な平面波が必要である。そこで、検査光学系のデザインを元にした光源を作製した（図 3A、赤の枠内）。この光源は直径  $10 \mu\text{m}$  ピンホールとコリメータレンズからなり、検査光学系との違いは、CMOS カメラがピンホールになっただけである。ピンホールはカメラより安定に保持できるので、その機械的安定度は、検査光学系と比べて、同程度以上である。さらに、直径  $10 \mu\text{m}$  ピンホールに対して、十分に大きいスポット径  $600 \mu\text{m}$  のレーザー（波長  $633 \text{ nm}$ ）を入射することで、レーザーのビーム位置安定性が検査に影響しないようにしている。

検査結果を図 3B に示す。1 点あたり 300 回の測定をおこない、その標準偏差を 1 フレームあたりの時間  $t_{\text{frame}}$  に対してプロットした。図中の最小の  $t_{\text{frame}} = 0.06$  秒でも、 $r_{1st} (= 0.05 \text{ mm})$  に比べて 3 桁高い精度で位置を決定できる。さらに、 $t_{\text{frame}}$  を 1 秒まで長くしていくと、CMOS 上での標準偏差は、時間の平方根に反比例して減少し、最終的に  $\pm 10 \text{ nm}$  になった。これは、 $t_{\text{frame}} < 1$  秒では、偏差の主要因が光子数ゆらぎによることを意味している。一方、 $t_{\text{frame}} > 1$  秒では、偏差は時間と共に増加した。長時間の領域に、あらわれる偏差は設置する定盤の剛性を向上させると減少するため、主に、定盤の歪みに由来すると考えられる。図 3B の結果から、以下の検査は  $t_{\text{frame}} = 1.5$  秒で行うことにした。この場合、CMOS 面でのビーズ散乱像の位置の標準偏差は  $\pm 10 \text{ nm}$  であり、試料面では  $\pm 0.1 \text{ nm}$  の精度になる。

【数ケルビンの蛍光顕微鏡の機械的ドリフトの評価】 図 4A に、図 2A の光学系を用いて測定した対物レンズと試料との機械的ゆれの結果を示す。右の縦軸は CMOS 面で検出されるビーズ散乱像の位置の標準偏差であり（図 3B の縦軸と同じ物理量）、これから見積もった対物レンズと試料との相対位置の変化の標準偏差を左の縦軸に示す。図の横軸の原点はヘリウムが超流動状態になった時である。定盤に対して、水平、鉛直方向  $(x, y)$  共に、ヘリウムが超流動状態になってから数時間で機械的安定性が增加していき、5.7 時間後に  $\pm 1 \text{ nm}$  に到達した。この条件であれば、文献 5, 6 の数 nm の位置決定は十分に実行可能である。

最高の性能となった 5.7 時間後における、基板と対物レンズとの相対位置の時間変化を図 4B, C に示す。図から、 $y$  軸は  $x$  軸に比べて、約 4 分間隔の数 nm の揺れがある。この周期は部屋のエアコンの ON OFF の周期と一致しており、部屋の温度変化により恒温槽に歪みが生じたためと考えている。

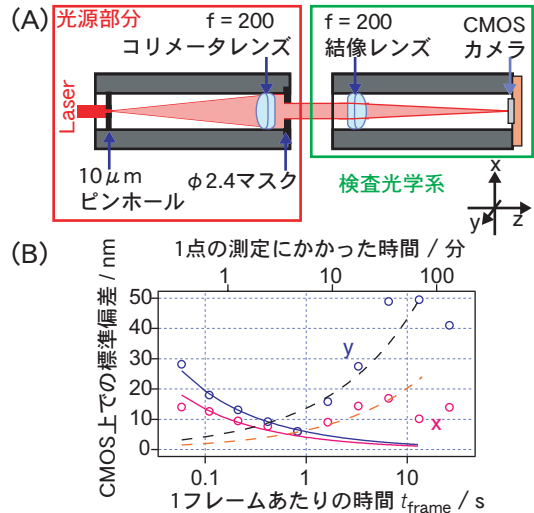


図3. 高精度位置決定装置. (A) 検査光学系の安定度の測定装置. (B) 検査結果. 1点当たり300回の位置測定を行いその標準偏差を  $t_{\text{frame}}$  に対してプロットした. 図中に、実線で  $1/\sqrt{t_{\text{frame}}}$ 、破線で  $\sqrt{t_{\text{frame}}}$  の曲線をあらわした。

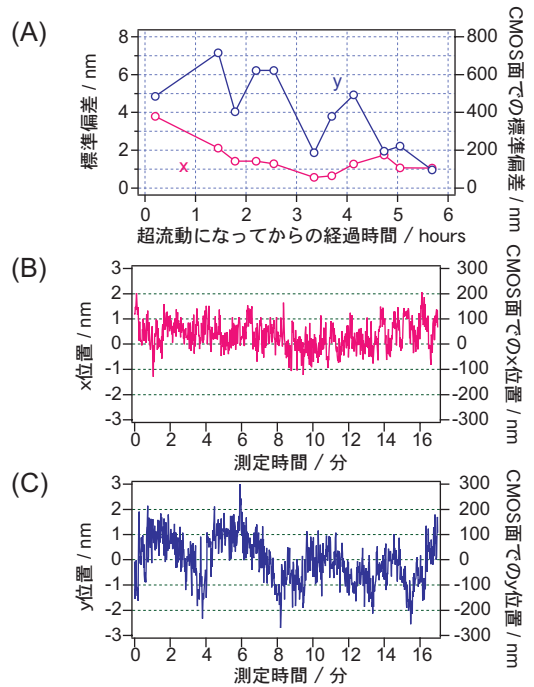


図4 (A) 基板と対物レンズとの相対位置の標準偏差 at 1.5 K.  $t_{\text{frame}} = 1.5$  秒で850回の測定を行いその標準偏差をプロットした. (B and C) 最も安定した時 (5.7時間後) の実測値. 右の縦軸がCMOS面で実際に観測されたビーズの動きであり、左の縦軸は倍率  $M = 100$  を割り算して見積もった対物レンズと試料との相対位置の変化。

1. Bobroff; *Rev. Sci. Instrum.*, **57**, 1152 - 1157 (1986).
2. Th. Schmidt, G.J. Schütz, W. Baumgartner, H.J. Gruber, H. Schindler; *J. Phys. Chem.*, **99**, 17662 - 17668 (1995).
3. A. Pertsinidis, Y. Zhang, S. Chu; *Nature*, **466**, 647-651 (2010).
4. M.J. Rust, M. Bates, X. Zhuang; *Nature Methods*, **3**, 793 (2006).
5. M. Matsushita, A. Bloëß, Y. Durand, J.Y.P. Butter, J. Schmidt, E.J.J. Groenen; *J. Chem. Phys.*, **117**, 3383 - 3390 (2002).
6. A. Bloëß, Y. Durand, M. Matsushita, H. van der Meer, G.J. Brankenhoff, J. Schmidt; *J. Microscopy*; **205**, 76 - 85 (2002).
7. S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, M. Matsushita; *Phys. Rev. Lett.* **100**, 168101 (2008).
8. S. Fujiyoshi, Y. Furuya, M. Iseki, M. Watanabe, M. Matsushita; *J. Phys. Chem. Lett.*; **1**, 2541 - 2545 (2010).
9. S. Fujiyoshi, M. Hirano, M. Matsushita, M. Iseki, M. Watanabe; *Phys. Rev. Lett.* **106**, 078101 (2011).
10. M. Fujiwara, S. Fujiyoshi, M. Matsushita; *J. Opt. Soc. Am. B*, **26**, 1395 - 1399 (2009).

## 2B12

## 数 K における単一タンパク質分光を用いた 可視蛍光タンパク質内のプロトン移動を伴った構造変化の観測

○藤原正規<sup>1</sup>、平野充遥<sup>1</sup>、渡辺正勝<sup>2</sup>、伊関峰生<sup>3</sup>、藤芳 暁<sup>1</sup>、松下道雄<sup>1</sup>

( <sup>1</sup>東工大院・理工、<sup>2</sup>光産業創成大・光バイオ、<sup>3</sup>東邦大・薬)

緑色蛍光タンパク質(GFP)は生体蛍光マーカーとして高い汎用性が示されている一方、複雑な発光過程を持つ[1]。この発光過程の理解は低温における分光研究によって大きく前進した[2, 3]。GFP には中性状態(A)と脱プロトン化状態(B)の二つの安定状態が存在する。温度 1.2 K において B の吸収極大 472 nm を励起すると 482 nm に蛍光極大が出現する。一方、A の吸収極大 429 nm を励起すると 440 - 460 nm に弱い蛍光帯、501 nm に強い蛍光極大が出現する。これは図 1(a)のように A が A\* に電子励起された後(“\*”は電子励起状態を表す)、励起状態プロトン移動(ESPT)が起き、A\*→I\*に変化する(I は中間状態を表す)。その後 501 nm の蛍光を放出して I\*→I へと脱励起すると解釈されている[2]。この解釈と GFP の立体構造解析から提案された GFP 発色団と周囲のアミノ酸側鎖の相対配置を図 1(b)に示す[4]。A↔I 間では水分子 W22、セリン(S)205 を経由して、発色団とグルタミン酸(E)222 の間でプロトンが移動する。一方、I↔B 間ではスレオニン(T)203 側鎖の回転を主とした構造変化が起きるとされる。しかし、このような構造変化が実際に実現されているかを直接観測するのは困難である。これは通常の分光測定の場合、光励起と同期しない構造変化が熱運動と集団平均の効果によって埋もれてしまうからである。構造変化を直接観測するには温度数 K に冷却して熱運動を抑制し、タンパク質一個の発光を時間追跡する方法が有効である。そこで我々は GFP の一分子測定から A, B 状態間の構造変化の観測を目指した。

GFP の A, B 状態間の構造変化を観測するには、各状態に対応するスペクトルが区別できなければならない。ここで、A, B 状態間の吸収極大の差(40 nm)は、I, B 状態間の蛍光極大の差(20 nm)の二倍大きい。このように吸収極大の差が大きいと、各状態の吸収スペクトルの線幅と比較しても十分に状態を区別することができる。従って我々は蛍光スペクトルではなく、吸収に相当する発光励起スペクトルから A, B 状態を区別すること考えた。ただし、B 状態のストークスシフトは 10 nm と小さく、吸収帯の長波長端まで測定ができない。そこで我々は GFP に蛍光色素 Alexa Fluor647(A647)を標識した。図 2 のように GFP の吸収波長域である 400 ~ 500 nm の領域を光励起すると、発色団が蛍光を放出する代わりに Förster 型共鳴エネルギー移動(FRET)によって励起エネルギーが A647 に移動してから蛍光を放つ。A647 の蛍光極大は 680 nm のため、実効的なストークスシフトを 200 nm に拡大することができ、発光励起スペクトルの吸収の長波長端まで測定可能となる。

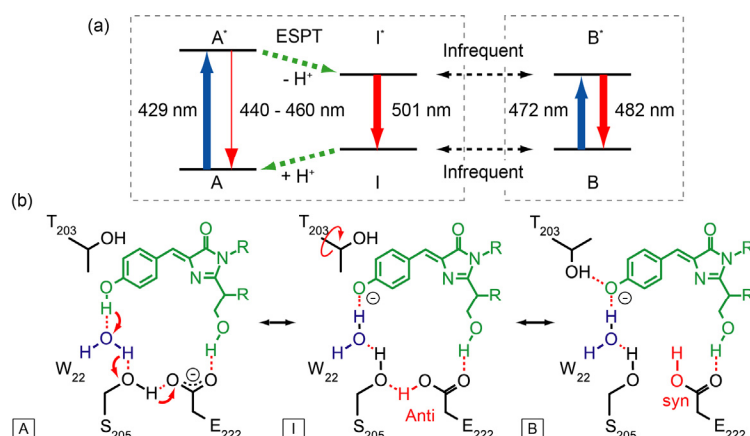


図 1(a): GFP の三状態エネルギーダイアグラム。図中の波長は温度 1.2 K での測定値[3]を引用。(b): 三状態に対応した発色団及びアミノ酸側鎖の配置。赤点線は水素結合を表す。文献[4]を参照して作図。

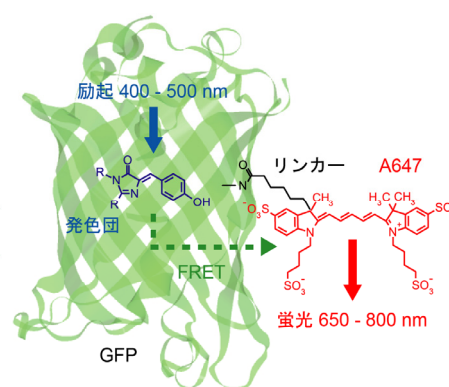


図 2: 標識した蛍光色素への Förster 型共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した単一 GFP の発光励起スペクトル測定。



低温、単一 GFP の発光励起スペクトル測定には二つの課題を解決する必要があった。一つは GFP の吸収波長から A647 の蛍光波長にいたる 400 ~ 800 nm の波長域において色収差が無視できる低温用光学系が必要であった。これは我々が開発した一体成形反射対物レンズ[5]を中心とした低温用共焦点顕微鏡によって解決した[6]。もう一つは単一 GFP の発光測定のため、回折限界のスポットに 100 W/cm<sup>2</sup> 以上の強度密度を持つ可視波長可変光源が必要であった。これはスーパーコンティニューム光(SC 光)と和周波発生(SFG)を利用した波長可変光源を開発することで解決した。本光源の概略図を図 3(a)に示す。フェムト秒パルスレーザーから射出した波長  $\lambda = 785$  nm の基本光の一部をフォトニック結晶ファイバー(PCF)に注入し、 $\lambda = 500 \sim 1600$  nm まで連続的に強度を持つ SC 光を発生させた。SC 光と残りの基本光をノッチフィルター上で同軸に揃えた後、BBO 結晶に集光し、SFG を起こした。この SFG 光をシングルモードファイバーで単一の空間モードに整形した後、共焦点顕微鏡へ導入した。SFG 光の波長掃引は位相整合条件を利用し、BBO 結晶の回転によって実現した。ただし、結晶の回転によって生じる基本光と SC 光の光路長のずれ、及び SFG 光の光路のずれは、それぞれ光学遅延路と結晶直後の色消しレンズの位置調整で補正した。また、波長に依らず強度を一定に保つため可変 ND フィルター(VND)を用いて調整した。これら 4 つの光学部品をそれぞれ電動ステージに配置し、SFG 光の波長ごとに自動制御した。図 3(b)にシングルモードファイバー射出直後の SFG 光の強度を示す。SFG 光の強度が波長に対して一定になるように VND で調整した結果、波長 402.5 nm ~ 507.5 nm の範囲で一定の強度 4.5  $\mu$ W を実現した。この強度を試料基板上的強度密度に換算すると 100 W/cm<sup>2</sup> 以上になる。図 3(c)に SFG 光スペクトルの半値全幅(FWHM)を示す。FWHM は波長に対してほぼ単調増加し、分解能 2.0 ~ 3.5 nm で波長掃引が実現できた。

図 4 に温度 1.5 K で測定した単一 GFP の発光励起スペクトルの時間変化を二例示す。図 4(a)は測定開始後 6 分まで 430 nm にピーク波長を持つスペクトルが、次の瞬間にスペクトル全体が 70 nm 長波長側に移動した。この変化は A\* $\rightarrow$ I\*への ESPT からアミノ酸側鎖の構造変化が生じ、B\*または B への遷移の瞬間を捉えたものと考えられる。一方、図 4(b)は測定開始後 470 nm のピークを持つスペクトルが数分間隔で発光と消光を繰り返した。この過程の中で、測定 12 分目にスペクトル全体が 10 nm 長波長に移動した後、15 分目には再び 15 nm 短波長に移動した。この変化は A、B 状態間の吸収極大の差と比較して小さく、A $\leftrightarrow$ B 間の構造変化とは考えにくい。おそらく、B 状態における発色団周囲の水素結合ネットワークが少なくとも二通り存在し、その間の移動が観測できたものと考えている。

[1] R. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509 (1998). [2] M. Chattaraj, et al., *PNAS*, **93**, 8362 (1996). [3] T. M. H. Creemers, et al., *Nature Struct. Biol.*, **6**, 557 (1999). [4] K. Brejc, et al., *PNAS*, **94**, 2306 (1997). [5] M. Fujiwara, et al., *J. Opt. Soc. Am. B*, **26**, 1295 (2009). [6] S. Fujiyoshi, et al., *PRL*, **106**, 078101 (2011).

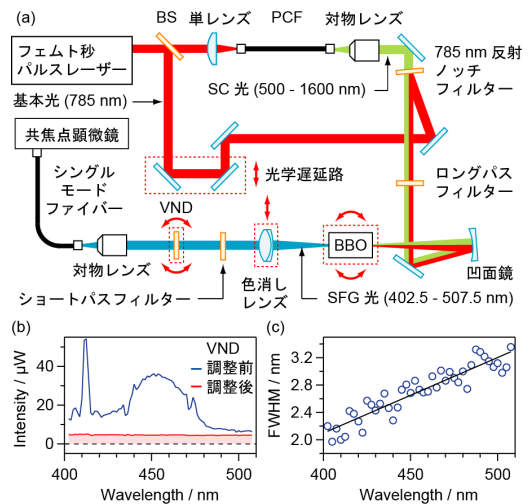


図 3(a): 可視波長可変光源。赤点線で囲まれた四つの光学部品の位置を自動制御することで、強度を一定に保つまま波長 400 ~ 500 nm まで波長掃引を可能にした。(b) & (c): シングルモードファイバー射出後の和周波光の強度とスペクトル線幅。

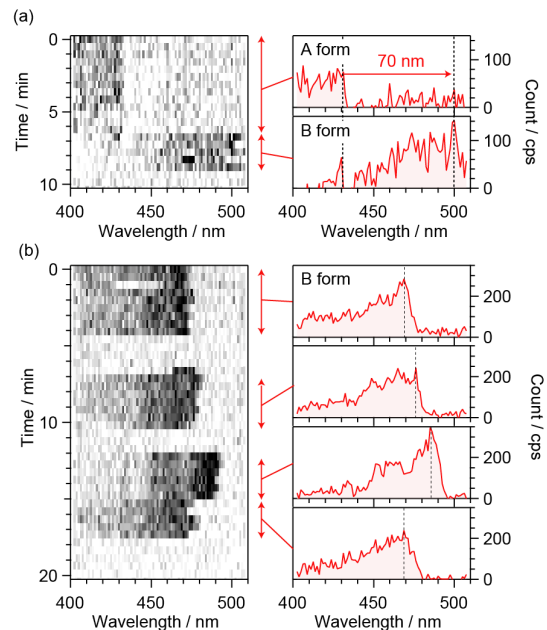


図 4(a) & (b): 温度 1.5 K で測定した単一 GFP の発光励起スペクトルの測定例。各矢印の領域をそれぞれ平均したスペクトル右側に示す。

## ラマン分光法による白血球中の脂質動態解析

(東大院理\*, NCTU 分子科学研究所\*\*)

○安藤正浩\*, 小野木智加朗\*, Kaliaperumal Venkatesh\*, Shraeddha Tiwari\*, 濱口宏夫\*\*

【序】ラマン分光法は、前処理を必要とせず、低侵襲で分子レベルの解析を行うことができることから、近年では医用分野への応用が進んでいる。本研究では、顕微ラマン分光法を白血球の分子レベル解析に応用し、臨床診断応用への足がかりを得ることを目的とした。白血球は、血液を構成する細胞の一つであり、免疫機能に深く関わっている。白血球の状態を知ることで、人体の健康状態や炎症反応についての情報を得ることが可能である。顕微ラマン分光法を用いた無染色・分子レベルの解析により、脂質、タンパク質、核酸、ヘム酵素、色素などの存在量、空間分布を得ることで、個々の白血球に関する詳細な情報を得ることが可能となるものと期待される。本研究では、白血球の活性化・炎症反応において重要な役割を担う脂質分子について、その分子構造、空間分布についての詳細な情報を得ることが可能であることを示す。

【実験】試料には、末梢血から採取した白血球を用い、ガラスボトムディッシュ上に接着した細胞を観測した。ラマン分光測定には、632.8 nm 励起共焦点顕微ラマン分光装置(対物レンズ x100 / NA 1.35, 空間分解能 面内 0.3  $\mu\text{m}$  奥行き 2  $\mu\text{m}$ )を用い、0.5  $\mu\text{m}$  間隔で試料ステージを移動させることでマッピング測定を行った。励起光強度は 18 mW, 各点の露光時間は 0.5 – 1 秒である。各測定点から得られるラマンスペクトルは、複数の構成分子種の混合物のスペクトルとして得られる。そこでデータ解析では、多変量解析のひとつである Multivariate Curve Resolution (MCR) を用いることで、スペクトルを分離し、各成分の空間分布情報を得ることを試みた。

【結果と考察】まず、白血球全体の 50 – 70 % を占める好中球から得られた代表的なラマンスペクトルを図 1 に示す。細胞質部分のスペクトルには、タンパク質に帰属されるバンド (1003, 1449, 1660  $\text{cm}^{-1}$ ) に加え、753, 1116, 1330, 1541, 1580, 1611  $\text{cm}^{-1}$  などに鋭いラマンバンドが多数検出された。好中球はミエロペルオキシダーゼ(MPO)と呼ばれるヘム酵素を細胞質中に有しており、これらが共鳴ラマン効果により検出されたものと考えられる[1]。MPO などのヘム酵素は、炎症反応の際に重要な役割を果たす分子であり、白血球の状態を知る上で重要なマーカーとなることが期待される。一方、核から得られたラ

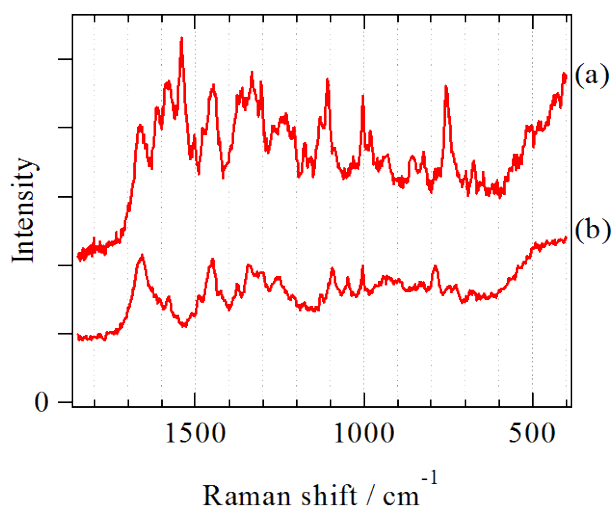


図 1. 好中球のラマンスペクトル (a) 細胞質, (b) 核

マンスペクトル (図 1(b)) からは、タンパク質のバンドに加えて、核酸に由来するバンド ( $788, 1580 \text{ cm}^{-1}$ ) がみられる。そしてこれらのラマンバンドから、各分子の細胞内分布が明瞭に可視化された (図 2)。

さらに、本手法を用いることで、これまで *in vivo* 解析が困難であった脂質についての情報を得ることが可能となる。幾つかの白血球からは、脂質分子の局在が検出された。全測定点から得られたスペクトルを MCR により多変量解析することにより、明瞭な脂質分子のスペクトル、及びその空間分布情報を抽出することができ (図 3)、脂質分子が細胞質内で、局所的に高濃度に分布している様子が可視化される。さらに、脂質成分のスペクトルは図 3 に示す通り、 $1658 \text{ cm}^{-1}$  の C=C 伸縮振動に帰属されるバンドが強く検出されている。不飽和結合を持つ代表的な脂質分子 (オレイン酸、リノレン酸、アラキドン酸、不飽和結合は各々 1, 3, 4 個) のスペクトルと比較すると (図 4)、不飽和結合を分子内に 4 つ持つアラキドン酸のスペクトルとよく類似していることが分かる。すなわち、細胞内において、高い不飽和度を持つ脂質分子を多量に含む脂質顆粒が存在することが確認された。アラキドン酸に代表されるエイコサノイドは、脂質メディエーターとして、白血球の炎症反応において重要な役割を担う分子である。これらの脂質顆粒は、白血球の活性化・炎症反応において様々な役割を果たすことも知られている[2]。ラマン分光法による白血球中の脂質解析は、基礎研究、臨床応用両面において、他の手法の追随を許さない基盤的手法となるものと期待される。

#### 【参考文献】

- [1] S. Brogioni, A. Feis, M. P. Marzocchi, M. Zederbauer, P. G. Furtmuller, C. Obinger, and G. Smulevich, *J. Raman Spectrosc.* **37**, 263 (2006).
- [2] P. T. Bozza, K. G. Magalhaes, and P. F. Weller, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 540 (2009)

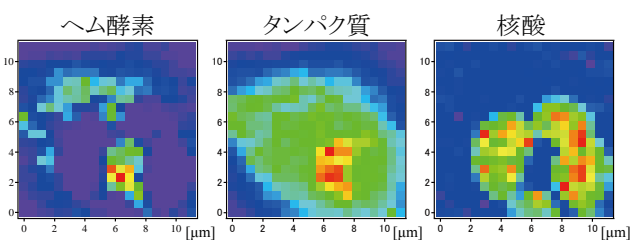


図 2. 好中球のラマンマッピング画像

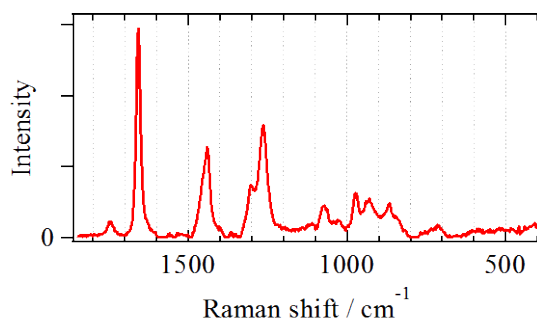
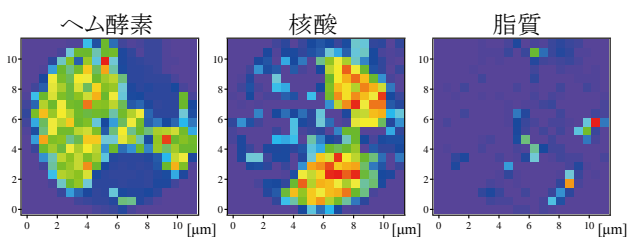


図 3. 脂質の局在が見られた白血球のラマンイメージ、及び脂質成分のスペクトル

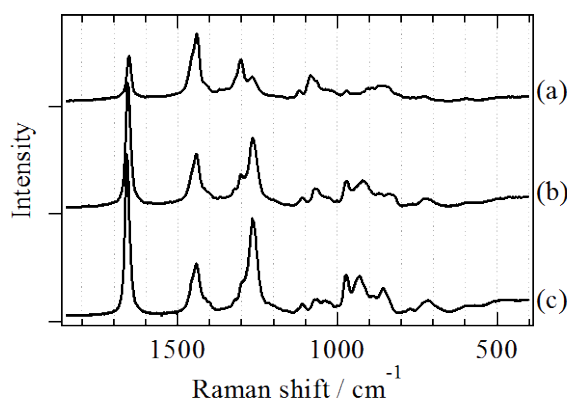


図 4. 脂質のラマンスペクトル (a)オレイン酸, (b)リノレン酸, (c)アラキドン酸

2B14

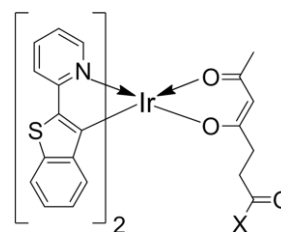
## 生体内低酸素領域を識別するためのイリジウム錯体の開発 および生体内発光特性

(群馬大院・工\*, 群馬大・ATEC\*\*, 秋田県立大生物資源科学\*\*\*, 群馬大学\*\*\*\*)

○吉原 利忠\*, 市川 和貴\*, 大堀 優佳\*, 小林 敦\*\*,  
穂坂 正博\*\*\*, 竹内 利行\*\*\*\*, 飛田 成史\*

【序】生体内低酸素領域は、日本人の3大死亡要因である‘がん’、‘脳卒中’、‘心筋梗塞’などの病態組織で共通に観測される特徴である。このため、生体内低酸素領域を簡便に識別することが、上記病態の早期発見、治療において重要視されている。我々は、これまでに酸素濃度に依存して発光強度、寿命が著しく変化する‘りん光’を用いて、ヌードマウスに移植した腫瘍の光イメージングについて報告してきた[1,2]。ここで使用したりん光プローブ分子はイリジウム錯体である。

イリジウム錯体は、配位子の構造に依存してりん光特性や化学特性(安定性、溶解性など)が制御できる特徴を有する。ヌードマウス内に投与されたイリジウム錯体は、血液中から細胞内に取り込まれ、低酸素細胞内において強いりん光を示していることを指摘している[2]。本研究では、赤色りん光を示すイリジウム錯体(BTP)のりん光特性を維持させたまま、細胞内移行性を向上させることを目指し、アセチルアセトン配位子を化学修飾したイリジウム錯体(図1)を設計・開発し、それらの溶液中、培養細胞中における発光特性の解明、および担がんマウスを用いた光イメージング、寿命測定について報告する。



X: OH                      BTPSA  
OCH<sub>2</sub>OC(=O)CH<sub>3</sub>      BTPAM  
NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>        BTPNH<sub>2</sub>  
NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>    BTPDM

図1 イリジウム錯体の構造式

【結果・考察】BTP 誘導体のテトラヒドロフラン中における吸収・りん光スペクトルを測定したところ、すべての錯体において485nm付近に吸収極大を示す<sup>1</sup>MLCT遷移に由来する吸収スペクトル、および615nm付近に極大波長を有するりん光スペクトルが観測された。また、りん光量子収率およびりん光寿命は、それぞれ、0.28-0.30、5.5-5.7μsであった。これより、アセチルアセトン配位子への化学修飾は、BTP 誘導体のりん光特性にほとんど影響を与えないことを示しており、りん光特性が維持できることが明らかとなった。

次に培養細胞(HeLa 細胞)を用いた結果について示す。図2にBTP 誘導体を最終濃度5μMになるように培地に添加し、2時間培養後、洗浄し、蛍光顕微鏡を用いて観察した顕微画像を示す。BTPSA、BTPAMは、BTPと比較してりん光強度が低く、また、同様な細胞内局在を示し

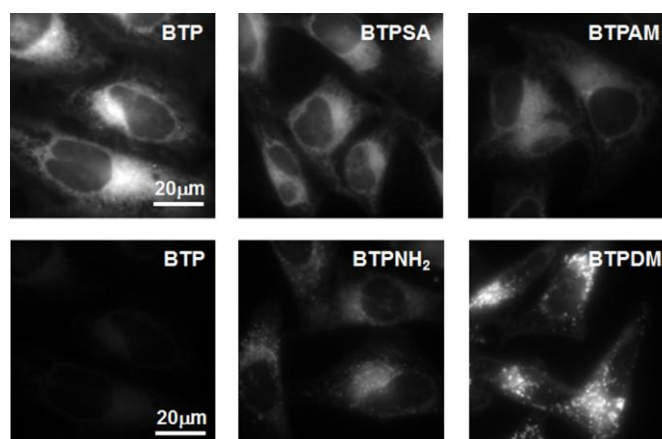


図2 各イリジウム錯体の HeLa 細胞中におけるりん光顕微画像



ている。一方、BTPNH<sub>2</sub>、BTPDM は BTP と比較して著しくりん光強度が増加しており、また、BTP において観測されていない斑状のオルガネラからりん光が観測されている。以上の結果から、BTPSA、BTPAM は細胞内移行性が向上しないのに対して、BTPNH<sub>2</sub>、BTPDM は、培地中においてアミノ基にプロトンが付加し、カチオン性分子となり細胞内移行性が向上したことがわかる。細胞内に取り込まれた BTPNH<sub>2</sub>、BTPDM の細胞内局在の経時変化を明らかにするため、最終濃度 5 $\mu$ M で 1 時間培養後、洗浄し、洗浄直後および 3 時間後に観察した顕微画像を示す(図3)。BTPNH<sub>2</sub> は、洗浄直後と 3 時間後において異なる細胞内局在を示している。一方、BTPDM は洗浄直後と 3 時間後でほぼ局在が変化していない。オルガネラ選択性を持つ蛍光プローブ分子を用いた比較実験より、BTPNH<sub>2</sub> は培養 1 時間後では主に小胞体に局在し、その後、斑状のオルガネラとして観測されるリソソームに局在が変化すること、BTPDM は培養 1 時間後において主にリソソームに局在し、その後、大きな変化が観測されないことが明らかとなった。

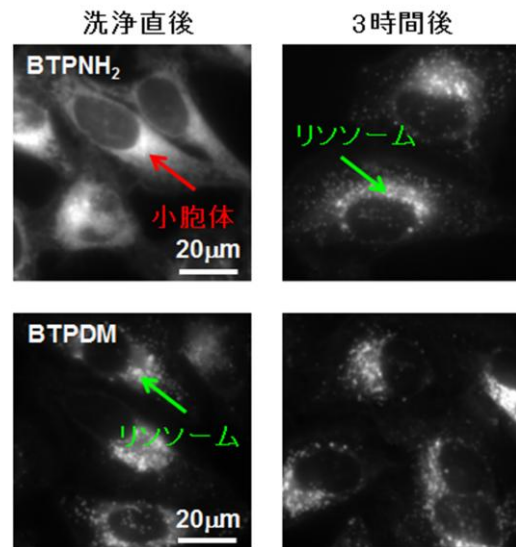


図3 HeLa 細胞中における BTPNH<sub>2</sub> および BTPDM の局在の時間変化

図4にマウス扁平上皮癌由来(SCC-7)細胞を移植した担がんマウスの尾静脈より、BTPDM 溶液(生理食塩水:DMSO(9:1, v/v))を 100nmol 投与し、2時間後に *in vivo* イメージングシステム(Maestro2, CRi)で観察した光イメージング画像を示す。マウスの自家蛍光(青)以外に、腫瘍から明瞭なりん光(赤)が観測されていることが分かる。BTP を用いた場合、腫瘍イメージングのための下限投与量が 200nmol であることから、BTPDM では、投与量を大幅に減少させられることが明らかとなった。これは、BTPDM の細胞内移行性が向上したためと考えられる。

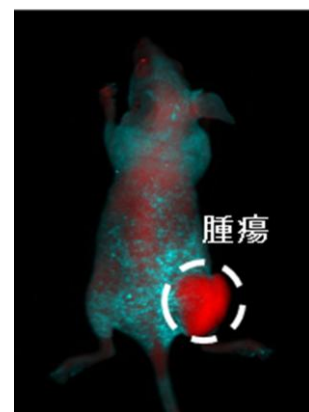


図4 BTPDM を投与したマウス扁平上皮癌由来(SCC-7)細胞を移植した担がんマウスの光イメージング画像

光イメージング画像は、発光強度を測定しているため、イリジウム錯体が腫瘍に高濃度で存在しているために、正常組織よりも強いりん光が観測される可能性がある。これを明らかにするために、我々は、*in vivo* でりん光寿命測定を行うことのできるシステムの開発を行い、BTPDM を投与した担がんマウスの正常組織と腫瘍からのりん光寿命を測定した。その結果、正常組織では 3.0 $\mu$ s、腫瘍では 4.7 $\mu$ s のりん光寿命が得られ、腫瘍では、正常組織よりも低酸素状態にあるため、光イメージング画像が得られていることが明らかとなった。発表では、りん光寿命をもとにした組織内酸素分圧についても議論を行う。

[1] T. Yoshihara *et al.*, *Proc. of SPIE*, **2009**, 7190, 71900X-1.

[2] S. Zhang *et al.*, *Cancer Res.*, **2010**, 70, 4490.



## 2B15

### ラマンイメージングにより明らかになった分裂酵母細胞周期中の物質分布および組成の協奏的变化

(台湾国立交通大学・応用化学<sup>1</sup>、東大院理<sup>2</sup>) ○重藤真介<sup>1</sup>、黄傳耿<sup>1</sup>、濱口宏夫<sup>1,2</sup>

**【序】** 生細胞は細胞周期を通じて、核酸・蛋白質・脂質などの細胞構成物質やオルガネラを正確に複製し娘細胞へと引き継いでいく。この過程は本質的に非常に動的な過程であり、細胞内の物質組成とその分布はさまざまな時間スケールで絶え間なく変化していると考えられる。従来の生化学的なアプローチでは時間的・空間的に平均化された情報しか得られず、生きた細胞中の物質組成や分布の変化を解析することは難しい。本研究では、面内空間分解能 0.3  $\mu\text{m}$ 、時間分解能 $\sim$ 10 分を有する自発ラマンイメージング法を用いて、分裂酵母生細胞の細胞周期(とくにその動的性質)を *in vivo* かつ分子レベルで解明することを目的とした。ラマンスペクトルに現れる多くのラマンバンドの強度マップ(マルチモード・ラマンイメージ)の時間変化を詳細に追跡することにより、細胞分裂の前後で、主要な細胞構成成分である蛋白質と脂質の濃度およびその分布が協奏的に変化することを見出した[1]。

**【実験】** 試料には分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) を用いた。YES 培地 (yeast extract 0.5%, glucose 3%, agar 1.7%, amino acids 0.02%) で培養した後、単一のコロニーを poly-D-lysine コート・ガラスボトムディッシュ上の PM 培地に移し替えたものを顕微鏡下での測定に用いた。試料の温度は 27  $^{\circ}\text{C}$  とした。

ラマンスペクトルの測定は自作の共焦点顕微ラマン分光装置[1,2]を用いて行った。ラマン励起波長は 633 nm である。試料におけるレーザーパワーは 1 mW とし、レーザー照射による細胞への影響を可能な限り抑えるようにした。積算時間は 1 点あたり 1.5 秒とした。したがって、分裂後の酵母細胞 2 個を含む領域 ( $11.5 \times 16 \mu\text{m}^2$ ) をスキャンするのにかかった時間はおよそ 18 分で、これが本測定の時間分解能を決めている。

**【結果と考察】** 分裂前後での酵母生細胞のラマンイメージの経時変化(15 時間後まで)を、主な 9 つの振動バンドについて示したものが図 1 である。まず、最左列に示した各時間における光学顕微鏡像から、分裂酵母細胞が細胞周期のどの段階にあるかを大まかに推定することができる。測定開始 0.5 時間後の酵母細胞は  $G_2$  期の終わりから M 期の初めにある。3 時間後までには体細胞分裂が完了して一次隔壁が形成されているのがわかる。この細胞は  $G_1/S$  期に入っていると考えられる。3.5 時間後には細胞質分裂が起き、細胞は 2 個の娘細胞に分裂している ( $G_2$  期)。これ以降 15 時間後まで、2 個の細胞は  $G_2$  期にあると考えられる。

では、ラマンイメージは細胞分裂とともにどのような変化を示すのであろうか? ここでは、9 つのラマンバンドをその帰属[3]によって 3 つのグループに分けた。グループ 1 (1440, 1301

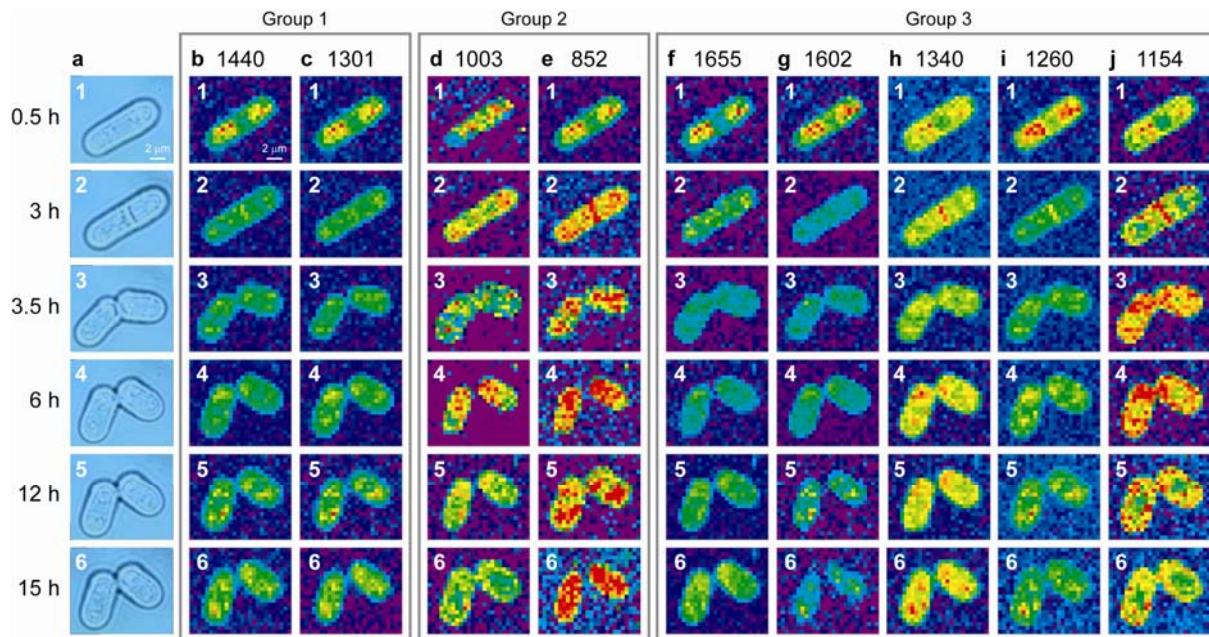


図 1: 分裂酵母 *S. pombe* 細胞の細胞周期ラマンイメージング。

$\text{cm}^{-1}$ )はリン脂質に、グループ 2 ( $1003, 852 \text{ cm}^{-1}$ )は蛋白質にそれぞれ帰属されるラマンイメージから成る。また、グループ 3 ( $1655, 1602, 1340, 1260, 1154 \text{ cm}^{-1}$ )のラマンイメージにはリン脂質、蛋白質、さらに隔壁の構成成分である多糖類が寄与していると考えられる。グループ 1 のラマンイメージから、リン脂質のバンド強度(濃度)が細胞分裂の開始(～3 時間後)とともに減少(赤・黄→緑)しているが、細胞質分裂後(3.5 時間後以降)は増加に転じていることがわかる。一方、グループ 2 のラマンイメージを見ると、蛋白質のバンド強度はリン脂質の減少と協奏的に増加し、細胞分裂後も引き続き増加していることがわかる。結果として、細胞分裂の進行に伴って、比較的リン脂質が多いラマンスペクトルから蛋白質が支配的なスペクトルへと変化していく。

このような動的かつ協奏的な細胞内物質組成および分布の変化は本研究で初めて得られた知見であり、単一細胞レベルでの研究だけでなく、時空特異的なアプローチが生命科学に不可欠であることを示している。今後、ラマン分光イメージングと生化学的な分析手法とを併用することで、この現象の生物学的な意義を解明することを目指す。講演では、脂質および蛋白質の濃度変化を定量的に見積もった結果や多変量解析を用いた結果についても議論する。

#### 【参考文献】

- [1] C.-K. Huang, H. Hamaguchi, and S. Shigeto, *Chem. Commun.* in press.
- [2] H. N. Noothalapati Venkata, N. Nomura, and S. Shigeto, *J. Raman Spectrosc.* in press.
- [3] H.-S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto, and H. Hamaguchi, *Biochemistry*, **44**, 10009 (2005).

## 顕微ラマン分光法による生細胞の定量イメージング

(東大院・理\*、NCTU \*\*) ○奥野将成\*、濱口宏夫\*\*

【序】現在実用されているバイオイメージング手法の中で、顕微ラマン分光法によるラマン分光イメージングは近年特に大きな注目を集めている。顕微ラマン分光法によって得られるラマンスペクトルは、“分子の指紋”と呼ばれるように、分子構造を鋭敏に反映し、分子レベルの豊富な情報を与える。染色を必要とせず、高い分子選択性を持つことから、顕微ラマン分光法は生細胞や組織などの生体試料の測定に応用され、どのような分子がどのような状態で、その中に含まれているのかを明らかにしてきた。

我々は本研究で、ラマン散乱が持つ定量性、すなわち「ラマン散乱光強度が、ラマン散乱光を出す物質の量に厳密に比例する」という性質を用いることにより、これまで他手法では容易に知り得なかった、細胞内物質の濃度を生きたままの状態で決定することを試みた。単位時間当たりに観測されるラマン散乱光の光子数は次のように表される。

$$\text{(単位時間に観測されるラマン散乱光 [光子数/s])} = \text{(分子の絶対ラマン散乱断面積 [cm}^2 \text{/sr])} \\ \times \text{入射光の光束密度 [光子数/s cm}^2\text{]} \times \text{(焦点中の分子数)} \times \text{(集光立体角 [sr])} \times \text{(検出効率)}$$

この積の中の、「絶対ラマン散乱断面積」は、ラマン散乱の基礎概念の一つであり、分子のラマンバンドに固有のものである。「絶対ラマン散乱断面積」および「分子数」以外の項は、実験条件によって決定されるものであるから、分子のラマンバンドの「絶対ラマン散乱断面積」を求めることが出来れば、焦点内の「分子数」を推定することが出来る。

これまで、いくつかの有機分子のバンドに対しては、絶対ラマン散乱断面積を求める試みが行われてきた。本研究ではそれを拡張し、生体分子に対して絶対ラマン散乱断面積を見積もり、それらの値を用いて生細胞中の分子濃度を推定した。

【実験】絶対ラマン散乱断面積の測定ならびに生細胞の顕微ラマン分光測定は、532 nm 励起の共焦点ラマン分光顕微鏡を用いて行った。絶対ラマン散乱断面積の測定においては、もっともよく絶対ラマン散乱断面積の研究が行われているベンゼンの環伸縮振動(992 cm<sup>-1</sup>)のラマンバンドを参照とし<sup>1</sup>、生体分子の偏光ラマン測定を行い、ラマンバンドの面積強度から絶対ラマン散乱断面積を求めた。測定した生体分子は、フェニルアラニン、シトクロム b および c の酸化および還元型などであり、これらを溶媒に溶解して測定を行った。また、測定系の波長依存性や偏光依存性を厳密に較正することによって、より確度の高いデータを得た。本実験で得られた絶対ラマン散乱断面積の実験誤差は 20 %以内である。

測定した生体試料は、マウス結合組織由来の L929(NCTC)細胞である。露光時間は一点あたり 2 秒、試料下でのレーザー出力は約 1 mW である。

【実験結果・考察】図 1(A)および(B)に、フェニルアラニン水溶液(73 mM)および還元型シトクロム c 水溶液(51 μM)から得た、平行成分および垂直成分の偏光ラマンスペクトルを示す。これらの偏光ラマンスペクトルの平行成分から、ラマンバンドの絶対ラマン散乱断面積の平行成分

( $d\sigma_{\parallel}/d\Omega$ )を、垂直成分から絶対ラマン散乱断面積の垂直成分( $d\sigma_{\perp}/d\Omega$ )をそれぞれ求めた。この二つの分子には、特徴的なラマンバンドが存在し、生体試料中の指標として用いられる。フェニルアラニンについては、ベンゼン環の呼吸振動に由来する  $1004\text{ cm}^{-1}$ 、還元型シトクロム c については、 $603\text{ cm}^{-1}$  のラマンバンドである。フェニルアラニンの  $1004\text{ cm}^{-1}$  のラマンバンドについて、 $d\sigma_{\parallel}/d\Omega = 0.96 \times 10^{-29}$ 、 $d\sigma_{\perp}/d\Omega = 0.05 \times 10^{-29}$  [ $\text{cm}^2/\text{molecule sr}$ ]、還元型シトクロム c の  $603\text{ cm}^{-1}$  のラマンバンドについて、 $d\sigma_{\parallel}/d\Omega = 2.5 \times 10^{-26}$ 、 $d\sigma_{\perp}/d\Omega = 4.6 \times 10^{-26}$  [ $\text{cm}^2/\text{molecule sr}$ ]と絶対ラマン散乱断面積を決定した。還元型シトクロム c のラマンバンドの絶対ラマン散乱断面積は、フェニルアラニンのものと比較して  $10^3$  倍程度大きな数値が得られた。これは、還元型シトクロム c のラマンバンドが、 $532\text{ nm}$  で励起することによって、共鳴ラマン効果により増強され、高感度に検出できることを示している。

次に、これらの生体分子のラマンバンドの絶対ラマン散乱断面積を用いて、生細胞中の生体分子濃度を決定した結果を示す。図 2 は顕微ラマン分光測定によって得られたラマン散乱光強度を、絶対ラマン散乱断面積を用いて分子濃度イメージに変換したものである。得られた分子濃度はラマン分光顕微鏡の共焦点体積内での平均値であるが、L929(NCTC)細胞の厚みが焦点深度よりも十分大きいため、およそ細胞内の分子濃度を表していると考えられる。図 2(A)および(B)は、フェニルアラニンの  $1004\text{ cm}^{-1}$ 、還元型シトクロム c の  $603\text{ cm}^{-1}$  のラマンバンドから、それぞれの分子濃度分布を見積もったものである。フェニルアラニンは  $20 \sim 40\text{ mM}$  の濃度

で、細胞内に比較的一様に分布していることが分かる。これは、 $10\text{ nm}$  立方中に  $20$  個程度フェニルアラニン分子が存在することに対応し、1つあたり数  $10\text{ nm}$  の大きさをもつタンパク質の中に、数  $10$  個のフェニルアラニン残基が含まれることに対応すると考えられる。一方、還元型シトクロム c の分布は、細胞内で局在しており、核と思われる細胞中心部にはほとんど観測されていない。このことから、還元型シトクロム c の分布は、細胞内のミトコンドリアの分布に対応していると考えられ、その中の還元型シトクロム c の分子濃度はおよそ  $10 \sim 20\text{ }\mu\text{M}$  であることがわかった。

このように、ラマンバンドの絶対ラマン散乱断面積を求め、顕微ラマン分光法を用いることで、非染色で生きた細胞内の物質濃度・分子数を決定することができた。

1. K. T. Schomacker, J. K. Delaney and P. M. Champion, J Chem Phys **85** (8), 4240-4247 (1986).

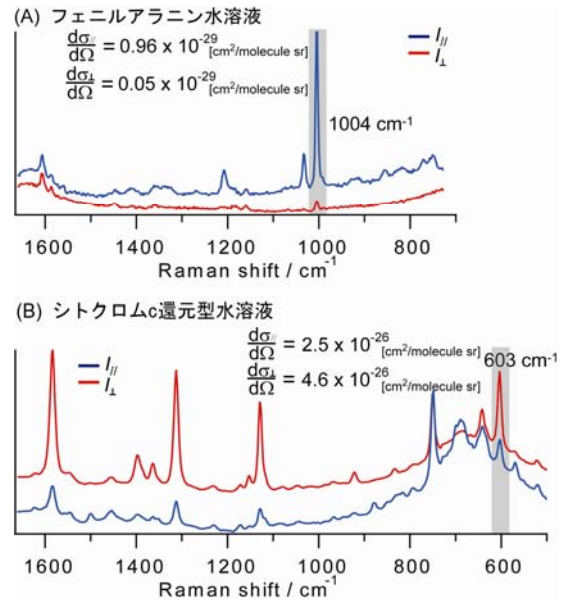


図 1 フェニルアラニン水溶液および還元型シトクロム c 水溶液のラマンスペクトルの平行成分( $I_{\parallel}$ )および垂直成分( $I_{\perp}$ )。

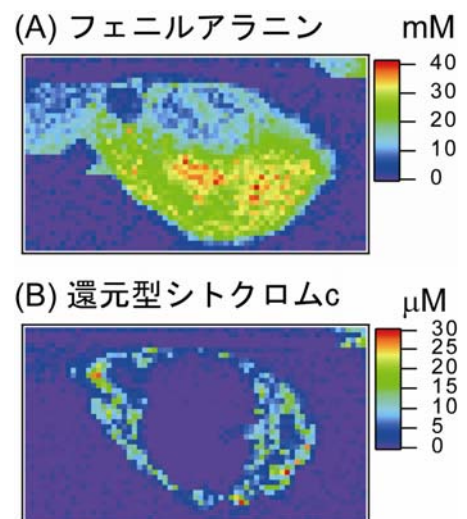


図 2 L929 (NCTC)細胞の、フェニルアラニンおよび還元型シトクロム c の濃度イメージ。