

時間分解ラマン分光イメージングによる単一生細胞内の 高速(10秒)分子ダイナミクス

(東大院理*, NCTU**) ○和田大我*, 小野木智加朗*, 濱口宏夫**

【序】

顕微ラマン分光法は、高い分子特異性を有し、蛍光物質の導入のような前処理を必要としないため、*in vivo* 条件下での細胞の低侵襲分子計測法として近年注目されている。当研究室では、顕微ラマン分光装置（励起波長 632.8 nm）の光学系の最適化を徹底的に追及し、生細胞試料に対して一点当たり数 100 ミリ秒の短い露光時間でのスペクトル取得を可能にした。また、短い露光時間で多数回の測定を行い、取得した多数のスペクトルに特異値分解（Singular Value Decomposition; SVD）解析を施すことで、スペクトルのノイズを除去した。図 1 に SVD 解析によるノイズ除去の結果を示す。

本研究においては、700 cm^{-1} から 1700 cm^{-1} の指紋領域を含む振動数領域と、3000 cm^{-1} 近辺の C-H 伸縮領域のラマンスペクトルを併せて取得し、細胞の一部のみをスキャンしてイメージングを行うことにより、細胞内における脂質の分布の変化を数秒程度の時間分解能で観察することを試みた。

【実験】

図 2 に測定に使用した装置の概念図を示す。試料からの蛍光を抑えるために、励起波長には He-Ne レーザーの 632.8 nm（試料上で 20 mW）を用いた。1 点当たりの露光時間は 0.1 秒であった。ボトムディッシュ上に Concanavalin A を用いて固定した分裂酵母細胞 (*Schizosaccharomyces pombe*) に、対物レンズにより絞り込んだレーザー光を照射した。ラマン散乱光は同じ対物レンズによって集められ、分光器へ導入され CCD カメラにて検出された。対物レンズの焦点と分光器導入直前の $f=100$ mm のレンズの焦点とが共役になっており、クロススリットを用いることにより共焦点効果を得て、光軸方向の空間分解能を確保した。光軸に垂直な方向の空間分解能は 0.3 μm 、光軸方向の空間分解能は 1.1 μm である。

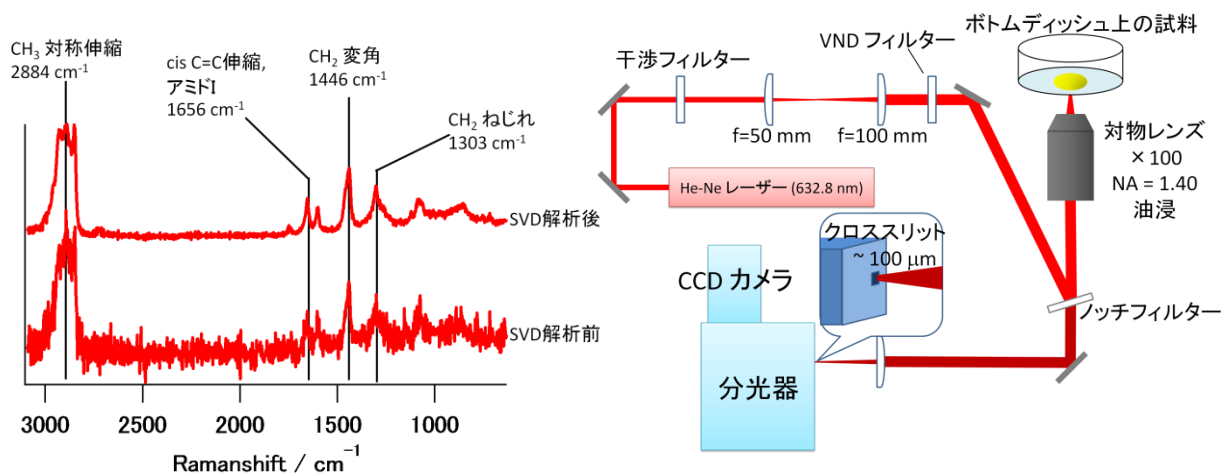


図 1: SVD 解析によるノイズの除去

図 2: 装置セットアップ

【結果と考察】

酵母細胞内の 3×3 ($0.8 \mu\text{m}$ 間隔) の9点をスキャンし、2.4秒で 3×3 のイメージを取得した。図3に細胞内の点Aと、Aから $0.8 \mu\text{m}$ 離れた点Bにおける、測定開始後から683秒後と878秒後のそれぞれの時刻でのラマンスペクトルを示す。これらのラマンスペクトルに見られるバンドは、いずれも脂質のバンドに帰属される。図4に測定した分裂酵母細胞の光学像と、点Aと点Bの細胞内での位置を示す。683秒後から878秒後に至るまでに、点Aでの各バンドの強度が大きくなり、逆に点Bでの強度が小さくなっている。このことから点Bから点Aへと分裂酵母細胞内の脂質が約200秒間で移動した可能性が示唆される。

図5に点Aと点Bにおける 1446 cm^{-1} のバンド (CH_2 変角振動) 強度の時間変化を示す。図3に示した683秒後から878秒にかけて数百秒のオーダーで起こるゆるやかな強度変化に加えて、十数秒のオーダーで起こる強度の変化が見られ、急激な脂質量の変化が見られる。

光学系の最適化により1点当たりの露光時間を可能な限り短くし、さらにSVD解析によるノイズ除去を施すことによって、1枚当たり数秒の時間オーダーで生細胞の部分的なラマンイメージングが可能となった。今後この手法を多くの系に応用することにより、細胞内の分子ダイナミクスの詳細が明らかになっていくものと期待される。

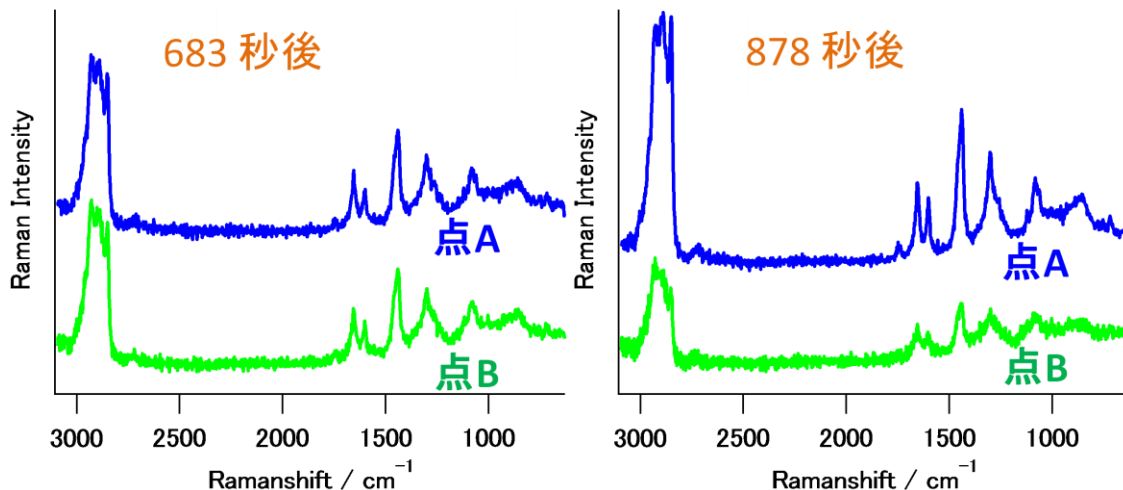


図3: 分裂酵母細胞のラマンスペクトル レーザーパワー: 20 mW, 露光時間: 0.1 秒

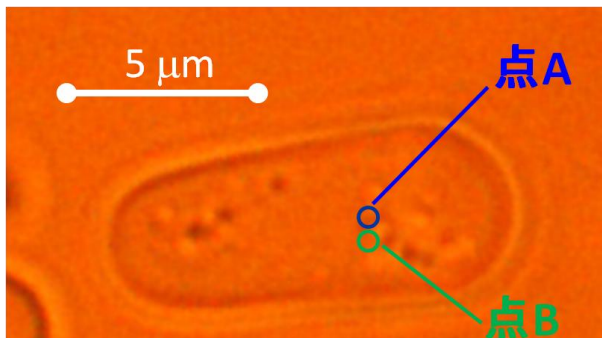


図4: 分裂酵母細胞の光学像, 点A、点Bの位置

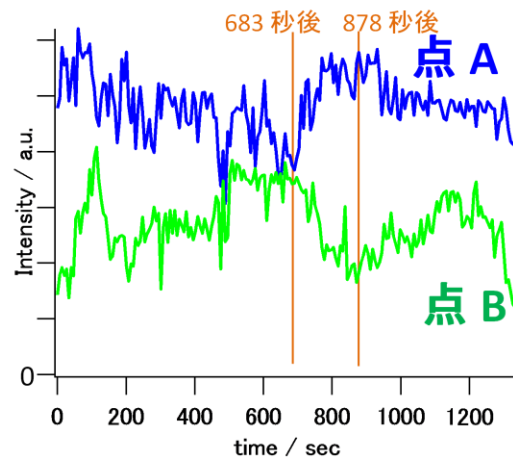


図5: 点A、点Bにおける 1446 cm^{-1} のバンド強度の時間変化