

## レーザートラッピングによる酵母細胞酸性度の 表面増強ハイパーラマン散乱マッピング

(関学大院・理工<sup>1</sup>、産総研・健康工学<sup>2</sup>)

○北濱 康孝<sup>1</sup>、林 宏彰<sup>1</sup>、伊藤 民武<sup>2</sup>、尾崎 幸洋<sup>1</sup>

## Surface-enhanced hyper-Raman scattering for mapping of acidity on yeast by optical trapping

(Kwansei Gakuin Univ.<sup>1</sup>, AIST<sup>2</sup>)

○Yasutaka Kitahama<sup>1</sup>, Hiroaki Hayashi<sup>1</sup>, Tamitake Itoh<sup>2</sup>, Yukihiko Ozaki<sup>1</sup>

### 【序】

近赤外光を集光することで微粒子を非接触に捕捉し、任意の位置に移動・操作できる手法がレーザートラップである。また、銀ナノ粒子に近赤外光を集光するとその表面に増強電磁場が発生するので、高感度な振動分光スペクトル、すなわち表面増強ハイパーラマン散乱(SEHRS)が測定できる。今回、銀ナノ微粒子を酵母にレーザートラップすることで、任意の位置から高感度・高空間分解能な SEHRS スペクトル測定を行うことに成功した。酵母は発酵を起こすことで酸性を示すことが知られており、周りの溶液を弱アルカリ性にしても市販のパン酵母はほぼ酸性を示したが、生物実験用の酵母ではしばしばアルカリ性を示した。また、酵母の様々な位置での酸性度が異なることが示された。

### 【実験】

クエン酸還元法で作製した銀ナノコロイド分散液に、パラメルカプト安息香酸(p-MBA)の飽和水溶液を等量加えた後、遠心分離して上澄みを捨てて蒸留水で洗浄し、元と同じ量にした。培養した酵母(ドライイースト、パイオニア企画; Yeast W303 Mat a Strain, フナコシ)は遠心分離して上澄みを捨てて蒸留水で洗浄することを二回行い、ホウ酸ナトリウムによる pH 調整液(pH=9)に分散させた。この p-MBA 修飾銀ナノコロイド分散液と酵母分散液を 3:1 の割合で混合したものを二枚のスライドガラスで挟んで試料とした。下方から cw 近赤外レーザー(1064 nm, 150 mW)を 60 倍の対物レンズ(NA=0.7)で集光して、銀ナノ微粒子を上面のポリ-L-リジン修飾スライドガラスに吸着した酵母に捕捉した。この銀ナノ微粒子からの SEHRS を同じ対物レンズでピンホールを通して分光器に導き、測定を行った。

### 【結果と考察】

p-MBA を修飾した銀ナノ粒子をレーザートラップで酵母細胞に捕捉して十数秒後に、p-MBA 由来の SEHRS スペクトルを測定することができた。1075 cm<sup>-1</sup>のピークは ring breathing mode、1585 cm<sup>-1</sup>は ring stretching mode と帰属される。1380 cm<sup>-1</sup>のピークは COO<sup>-</sup>に由来しており、前二者に対する相対強度が小さければ酸性を示していることになる[1]。酵母は発酵を起こすことで酸性を示すことが知られている。周りの溶液を pH 調整液(ホウ酸ナトリウム)で弱アルカリ性にし

ても、市販のパン酵母ではほとんどの場合、 $1380\text{ cm}^{-1}$ のピークが現れずに酸性を示した。一方、生物実験用の酵母では $1380\text{ cm}^{-1}$ のピークがしばしば現れた。これは、パン酵母の方が発酵効率が良いことを示していると考えられる。また、酵母の様々な位置での $1380\text{ cm}^{-1}$ のピーク相対強度が異なる、すなわち酸性度が異なることが示された(図1)。

通常の銀ナノ粒子を酵母細胞にレーザートラップで捕捉したところ、すぐに泡が発生して測定ができなかった。しかし、p-MBAを吸着させた銀ナノ粒子の場合、泡は発生せずに測定できた。この場合、表面増強ハイパーレイリー散乱(532 nm)が強く観測されており、光熱変換が抑制されSEHRSが測定できたと考えられる。さらに、レーザートラップしている最中にp-MBA以外のピークが数回観測された(図2)。これらのスペクトルは酵母細胞からのSEHRSの可能性はある。

一方、レーザートラップにより酵母細胞に多量の銀ナノ粒子を捕捉し、532 nmの励起光を照射して測定したSERSスペクトルも図2に示す。 $975\text{ cm}^{-1}$ はデオキシリボースに関する振動である。これは、酵母細胞のDNAが確認されており細胞質の部分まで観測できたと言える。 $1088\text{ cm}^{-1}$ は $\text{NH}_2$ ねじりの振動、 $1136\text{ cm}^{-1}$ はC-CNの振動、 $1225\text{ cm}^{-1}$ はアミドIIの振動、 $1344\text{ cm}^{-1}$ は $\text{NH}_2$ の振動、 $1422\text{ cm}^{-1}$ は $\text{CH}_3$ の非対称伸縮振動と $\text{COO}^-$ の振動、 $1525\text{ cm}^{-1}$ はアミドIIの振動、 $1600\text{ cm}^{-1}$ はフェニルアラニンとチロシンの振動と考えられる[2]。このように、酵母細胞からのSEHRSとSERSが測定できたものと考えられる。

#### 【参考文献】

- [1] J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig, K. Kneipp, *Nano Lett.* **7**, 2819, (2007)  
 [2] A. Sujith, T. Itoh, H. Abe, K. Yoshida, M. S. Kiran, V. Biju, M. Ishikawa, *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1803, (2009)

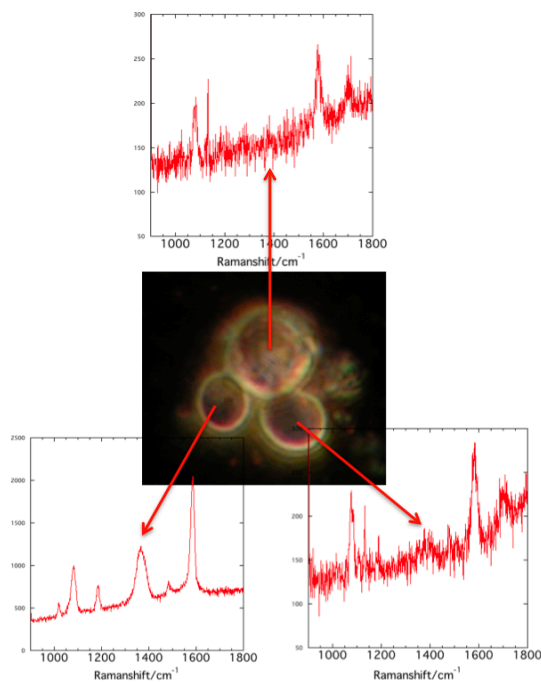


図1 各酵母細胞での p-MBA の SEHRS スペクトル

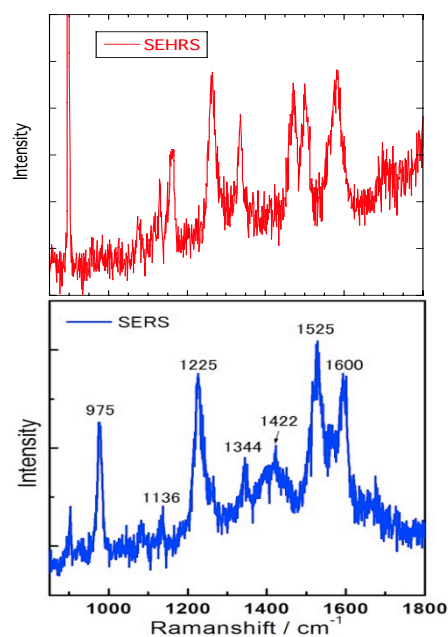


図2 p-MBA吸着銀ナノ微粒子をレーザートラップした酵母からのSEHRS(上)と、多量の銀ナノ粒子を捕捉した酵母からのSERS(下)