

超低振動数顕微ラマン分光法を用いた細胞内分子温度計測の試み

関学大院理工

○島端要典, 安田充, 重藤真介

Measurement of Intracellular Molecular Temperature Using Ultralow-Frequency Raman Microspectroscopy

○Yosuke Shimabata, Mitsuru Yasuda, Shinsuke Shigeto

Graduate School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University, Japan

【Abstract】 Temperature is one of the most fundamental physical parameters that are related to complex chemical reactions of biomolecules. However, it remains challenging to measure local temperature inside a single living cell without introducing a temperature sensor that might perturb cell's physiological states. In this study, we construct a confocal Raman microspectrometer that can measure ultralow-frequency Raman spectra in both Stokes and anti-Stokes regions simultaneously with a subcellular space resolution and thereby enables intracellular temperature measurement. First we characterize space-resolved intermolecular vibrational spectra of single living yeast cells. We then use liquid water to estimate its temperature using a Stokes/anti-Stokes intensity ratio. The estimated temperature of water is compared with that measured with a thermocouple in order to discuss the accuracy of the temperature measurement with our Raman apparatus.

【序】 温度は、生体分子の複雑な化学反応に関わる重要な物理量の一つであり、その精確な計測は生命現象の解明に不可欠である。従来の技術では、細胞内の局所温度を温度センサーの導入なしに測定することは困難であった。本研究では、ストークス・アンチストークス両方で超低振動数領域 ($\pm 15 \text{ cm}^{-1}$) まで測定可能な共焦点顕微ラマン分光装置を構築し、アンチストークス対ストークス強度比に基づいた細胞内分子温度計測への応用を試みた。まず、細胞内温度計測と関連して酵母生細胞の低振動数ラマンスペクトルを測定し、細胞内の分子間相互作用について調べた (実験 1)。次に、構築した顕微ラマン分光装置による温度計測の性能評価を行うために水の低振動数ラマンスペクトルの解析 (実験 2) を行った。

【実験 1】 分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 細胞を YES 培地にて前培養し、poly-D-リジンコートガラスボトムディッシュ中の PM 最少培地へ移したものを測定試料とした。低振動数領域のラマンスペクトル測定には、He-Ne レーザー (波長 632.8 nm) を励起光源とし、体積ブラッグ回折格子 (BragGrate, OptiGrate) を超狭帯域ノッチフィルターとして組み込んだ自作の共焦点顕微ラマン分光装置を用いた。この装置の空間分解能は面内方向で $0.5 \mu\text{m}$ 、深さ方向で $4.8 \mu\text{m}$ と見積もられた。

細胞分裂途中の *S. pombe* 細胞の空間分解ラマンスペクトルの指紋領域及び低振動数領域をそれぞれ図 1a,b に示す。用いたレーザーパワーは 3 mW、露光時間は 300 s であった。図 1b では、基本音のみの寄与を抽出するため実測のラマンスペクトル $I_{obs}(\tilde{\nu})$ を式(1)により変換した還元ラマンスペクトル $I_{red}(\tilde{\nu})$ を示した。

$$I_{red}(\tilde{\nu}) = \left[1 - \exp\left(\frac{-hc\tilde{\nu}}{k_B T}\right) \right] (\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu})^3 I_{obs}(\tilde{\nu}) \quad (1)$$

ここで $\tilde{\nu}_0$ は励起光の絶対波数、 $\tilde{\nu}$ はラマンシフト、 c は光速、 h はプランク定数、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度（ここでは 273.15 K を仮定）である。

1655–1660 cm^{-1} 付近に観測されるアミド I バンドは、タンパク質の二次構造の違いによりピーク位置が異なることが知られている。このことから、図 1a のスペクトル 4,5 はスペクトル 1,2,3 と異なるタンパク質二次構造を反映していると考えられる。対応する低振動数領域の還元ラマンスペクトル（図 1b）の 100–200 cm^{-1} 領域において、スペクトル 1,2,3 と 4,5 とではその形状にわずかな違いが見られた。この結果は、アミド I バンド（図 1a）で観測されたピーク位置の違いや、細胞内の分子クラウディングを反映した水の性質の変化などに関連している可能性があり、その詳細な解析により細胞内での分子間相互作用に関する新たな知見が得られるものと期待される。

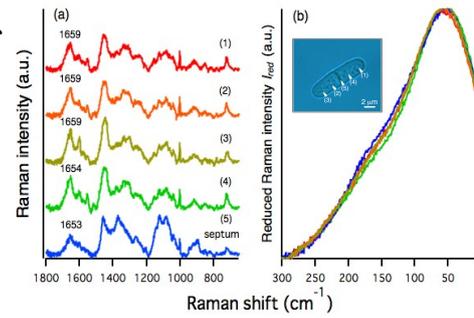


Fig. 1. Space-resolved Raman spectra in the fingerprint region (a) and the ultralow-frequency region (b) measured at different points 1–5 within a single living *S. pombe* cell.

【実験 2】 非共鳴ラマン散乱におけるアンチストークス対ストークス強度比 $I_{\text{anti-Stokes}}/I_{\text{Stokes}}$ は式(2)で与えられる。

$$\frac{I_{\text{anti-Stokes}} (\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu})^{-3}}{I_{\text{Stokes}} (\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu})^{-3}} = \exp\left(-\frac{ch\tilde{\nu}}{k_B T}\right) \quad (2)$$

この式の左辺は実測の低振動数ラマンスペクトルから求められるので、分子温度 T を実験的に決定することができる。信号強度比から温度を正確に求めるためには、分光装置の感度校正が鍵となる。岡島と濱口は N_2 の純回転スペクトルを用いて感度校正を行うことにより、水の温度を 1 K 以下の誤差で見積もることに成功している[1]。しかし、この研究は 20 倍の対物レンズを用いたデモンストレーションであり、単一細胞への応用に必要な空間分解能を有していない。

0.2 nm 間隔で強度の相対値が保証されている標準光源 (IntelliCal, Princeton Instruments) による感度校正を行った超純水の低振動数ラマンスペクトル（レーザーパワー 5 mW、露光時間 300 s）を図 2 に示す。この実測スペクトルから計算される式(2)左辺の量を、絶対温度 T をパラメーターとする指数関数でフィットしたところ（図 3）、水の温度は $28.7(\pm 0.6)^\circ\text{C}$ となった。熱電対により測定したレーザーの集光点近傍の温度と比較すると、+3 $^\circ\text{C}$ 程度の誤差が見られた。現在、ラマン分光装置の更なる改良により、測定温度の確度ならびに再現性向上を行っている。

【参考文献】

[1] H. Okajima and H. Hamaguchi, *J. Raman Spectrosc.* **46**, 1140 (2015).

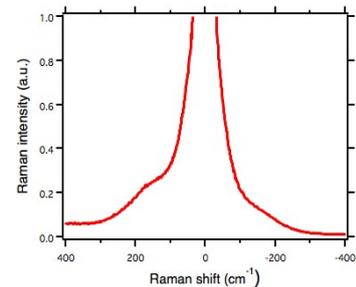


Fig. 2. Raman spectrum of water.

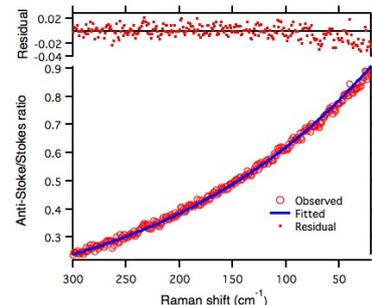


Fig. 3. Frequency-scaled anti-Stokes/Stokes intensity ratio (red circles) and the best fit to an exponential function (blue line). Red dots indicate the fitting residual.