

生細胞の細胞膜付近における分子の動態の解明に向けた
全反射ラマン/蛍光顕微鏡の構築

¹東北大薬, ²東北大院薬

○炭谷双葉¹, 梶本真司^{1,2}, 中林孝和^{1,2}

Construction of a total internal reflection (TIR) Raman/Fluorescence microscope to observe molecular dynamics in a living cell membrane

○Futaba Sumitani¹, Shinji Kajimoto^{1,2}, Takakazu Nakabayashi^{1,2}

¹ Faculty of Pharmaceutical Science, Tohoku University, Japan

² Graduate School of Pharmaceutical Science, Tohoku University, Japan

【Abstract】 Knowledge on properties of plasma membrane is important to understand physiological processes in cells since signal transduction and ion transport occur across plasma membrane. Molecular dynamics in plasma membrane has generally been studied using fluorescence techniques, such as single-molecule tracking and fluorescence recovery after photobleaching. Using these techniques, however, it is difficult to monitor the distribution and behavior of endogenous molecules within membranes. In the present study, we have constructed a total internal reflection (TIR) microscopic system measuring Raman and fluorescence of molecules in cell membranes. With TIR illumination, Raman spectra only from endogenous molecules near or within the cell surface can be obtained. Also, TIR illumination enables us to observe single-molecule fluorescence by suppressing the background fluorescence. In this presentation, we show Raman spectra of living cells obtained with TIR illumination. We discuss differences in molecular distribution by comparing the spectra with TIR and wide-field illumination. Behavior of fluorescent molecules observed with TIR microscopy will also be discussed.

【序】 細胞の内と外を分ける細胞膜は、膜表面にあるチャネルを介したイオンの輸送や受容体を介したシグナルの伝達を担うなど、細胞の生存に不可欠である。このような細胞膜近傍での分子の挙動に関しては、これまでに1分子蛍光追跡[1]やFRAP(光褪色後蛍光回復法)[2]など蛍光色素を用いた研究が多くなされてきた。これらの手法では蛍光分子の挙動から環境を推測するため、膜付近における生体分子自身の分布や挙動に関する知見を得ることは難しい。我々は膜付近の生体分子を直接観測し、その分布や挙動と膜の性質の関係の解明を目的として全反射ラマン/蛍光顕微鏡を構築した。

屈折率が高い媒質から低い媒質へと光が侵入する時、入射角が臨界角を超えると界面で全反射が起こる。その時、屈折率が小さい物質側にエバネッセント波がしみだす。このエバネッセント波のしみこむ深さは、光の波長や入射角、屈折率によって異なるが100 nm程度であり、界面近傍の分子のみに由来するラマンスペクトルの獲得が可能になる。また全反射照明を用いることにより、背景光を抑えることができるため、1分子蛍光の観測が可能となる。これらのことから、全反射ラマン/蛍光顕微鏡を用いることで生細胞の細胞膜付近における分子の動態を直接観測することができると期待される。本発表では、全反射ラマン顕微鏡を用いて得られた生細胞の細胞膜付近のラマンスペクトルと広視野ラマン顕微鏡を用いて得られた生細胞のラマンスペクトルの比較や、全反射蛍光顕微鏡を用いた生細胞中の蛍光色素の1分子蛍光の観測結果について紹介する。

【方法 (実験・理論)】 Fig.1 に実験装置の概略図を示す。励起光として cwNd:YAG レーザー(532 nm,40mW)を用い、対物レンズとして高 NA を示す油浸対物レンズ(x100, NA=1.49, UAPON 100XOTIRF, OLYMPUS)を用いた。全反射と広視野顕微観察は簡便に変換することができる。顕微鏡直前のレンズを用いてレーザー光を対物レンズの後焦点面に集光することで広視野照明とし、レンズの焦点距離にあるミラーの角度を調整することによって全反射照明とすることができる。

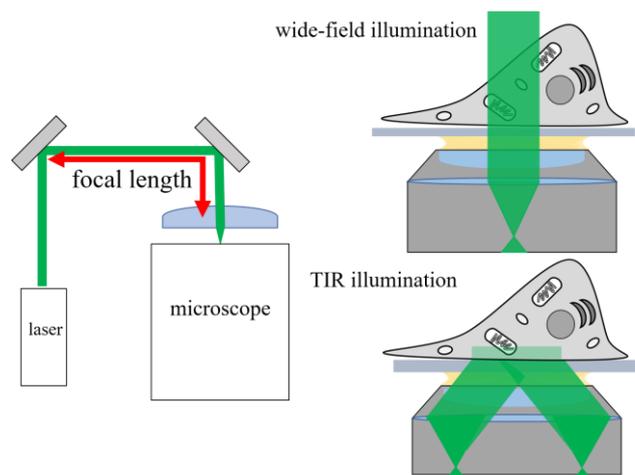


Fig. 1. Schematic image of a TIR microscopy

全反射ラマン顕微鏡では、全反射の配置でラマン散乱光を得た後に、対物レンズによってラマン散乱光を集光する。次に、結像面に設置したピンホールに通した後に、レンズを用いて分光器に導入し、冷却 CCD により測定した。試料にはガラススペースディッシュ上に培養した人由来のがん細胞株である HeLa 細胞を用いた。

【結果・考察】 Fig.2 に広視野照明と全反射照明で得られた HeLa 細胞のラマンスペクトルを示す。C-H 伸縮振動バンド(2920 ~ 2932 cm^{-1})のピーク強度で規格化してある。測定時間はそれぞれ 1 分と 10 分、レーザー強度は 28 mW である。広視野照明では 1652 cm^{-1} のアミド I や 998 cm^{-1} のフェニルアラニン(Phe)の細胞特有のラマンバンド [3]の他に、1580、1308、1122、742 cm^{-1} にシトクロム *c* の共鳴ラマンバンドが観測された。シトクロム *c* は細胞質中のミトコンドリア内膜に存在することが知られているため、広視野照明によるラマンスペクトルは HeLa 細胞の細胞質のラマンスペクトルであることがわかる。一方、全反射照明により得られたラマンスペクトルでは、広視野照明のスペクトルに比べ、アミド I の相対ピーク強度はほとんど変化していないが、シトクロム *c* のピーク強度が減少していた。この結果は、全反射ラマン顕微鏡において細胞膜付近のラマンスペクトルを選択的に測定できたことを示している。現在、S/N 比を向上するために装置や測定方法の改良を行っている。発表ではさらに全反射蛍光顕微鏡を用いた細胞中の 1 分子蛍光観測についても紹介する。

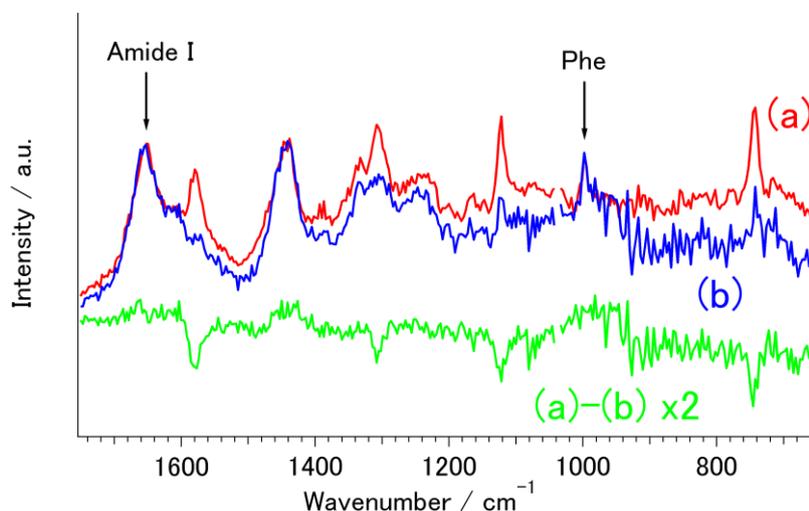


Fig. 2. Raman spectra of single HeLa cell obtained with (a) wide-field illumination and (b) TIR illumination. The difference spectrum obtained by subtracting the wide-field spectrum (a) from the TIR spectrum (b) is also shown with green line.

【参考文献】

- [1] M. J. Saxton *et al.* *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 373 (1997).
- [2] E. A. J. Reits *et al.* *Nat. Cell Biol.* **3**, E145 (2001).
- [3] K. Hamada *et al.* *J. Biomed. Opt.* **13**, 044027 (2008).