

## 超低振動数顕微ラマン分光法を用いたバイオフィーム内の 温度および分子クラウディングの評価

関学大院理工

○吉川友貴, 島端要典, 安田充, 重藤真介

### Evaluating Temperature and Molecular Crowding in Biofilms by Ultralow-Frequency Raman Microspectroscopy

○Yuki Yoshikawa, Yosuke Shimabata, Mitsuru Yasuda, Shinsuke Shigeto  
*Department of Chemistry, Kwansei Gakuin University, Japan*

**【Abstract】** Biofilms, which are structured communities of microorganisms, exhibit distinctly different properties from their planktonic counterparts and, such as, they have been attracting keen interest. Temperature is one of the most important physical quantities that determine the state and reactivity of chemical substances in biofilms and hence affect many biological processes taking place therein. Viscosity is another factor of importance that reflects intermolecular interactions in a highly dense biological environment (known as molecular crowding). Here we present that ultralow-frequency ( $<200\text{ cm}^{-1}$ ) Raman spectra can be utilized to obtain information on molecular temperature and intermolecular interactions in biofilms with high spatial resolution. We constructed a confocal Raman microspectrometer capable of measuring Raman spectra down to  $\pm 10\text{ cm}^{-1}$ . For measuring biofilm temperature, we derived correction coefficients for each anti-Stokes-to-Stokes intensity ratio by using the Raman spectrum of liquid water with a known temperature. In addition, by converting observed low-frequency Raman spectra of biofilms to "reduced" spectra, we attempted to evaluate the degree of molecular crowding in a biofilm environment.

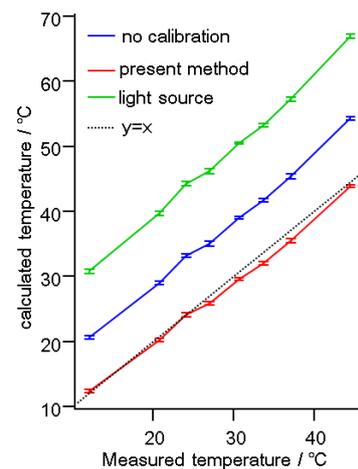
**【序】** バイオフィーム (BF) は抗生物質耐性などの性質が浮遊状態の微生物とは大きく異なることが知られており, そのような BF 特有の性質の理解には BF の分子レベルでの研究が必須である. 温度は BF 中の物質の状態や反応性を決める重要な物理量である. また, 極めて混み合った生体環境 (分子クラウディング) 中の分子間相互作用を反映すると考えられる粘度も, BF を特徴付ける重要なファクターである. 我々は低振動数 ( $<200\text{ cm}^{-1}$ ) 領域のラマンスペクトルを用いれば, 生きた BF 内の温度および分子間相互作用に関する情報を高空間分解能で得られることに着目し, ストークス・アンチストークス領域両方で約  $10\text{ cm}^{-1}$  まで測定可能な共焦点顕微ラマン分光装置を構築した. BF 内温度測定に向け, 温度が既知の水のラマンスペクトルを用いてアンチストークス対ストークス強度比の補正を行った (実験 1). また, BF の超低振動数ラマンスペクトルを測定し, 温度を仮定して還元スペクトルに変換することで BF 内の分子クラウディングに関する情報の取得を試みた (実験 2).

**【実験 1】** 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  $I_{as}/I_s$  は, 式(1)で与えられる:

$$I_{as}/I_s = [(\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu})/(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu})]^3 \exp(-hc\tilde{\nu}/k_B T) \quad (1)$$

ここで  $\tilde{\nu}$  はラマンシフト,  $\tilde{\nu}_0$  は励起レーザーの波数,  $c$  は光速,  $h$  はプランク定数,  $k_B$  はボルツマン定数,  $T$  は絶対温度である.  $I_{as}/I_s$  から正確に温度  $T$  を求めるためには分光

装置の感度校正が重要になる．そこで，熱電対により温度 $T_{\text{obs}}$ を測定した水の低振動数ラマンスペクトルから計算される $I_{\text{as}}/I_{\text{s}}$ の実測値で，式(1)に既知温度 $T_{\text{obs}}$ を代入して得られる $I_{\text{as}}/I_{\text{s}}$ の理論値を割ることにより，強度比 $I_{\text{as}}/I_{\text{s}}$ の補正係数を求めた．ここでは常温（24.0 °C）の水の低振動数ラマンスペクトル（532 nm 励起，試料におけるレーザーパワー3 mW，露光時間 90 s，測定回数 10 回）を用いた．水の温度を変化させて低振動数ラマンスペクトルを測定し，上記の補正方法および市販の標準光源（IntelliCal, Princeton Instruments）による感度校正を用いて得られた温度と熱電対による実測値の比較を Fig. 1 に示す．本手法の方が，点灯条件の制御と再現が難しい標準光源を用いた方法よりも確度よく温度を決定できることが示された．熱電対による測定値との誤差は最小 0.3 K，最大 1.7 K であった．最小値は，N<sub>2</sub> の回転ラマンスペクトルを用いる方法[1]と比べて同程度に良いが，本手法では高 NA の対物レンズを用いて圧倒的に短い測定時間で補正が行えるという利点がある．

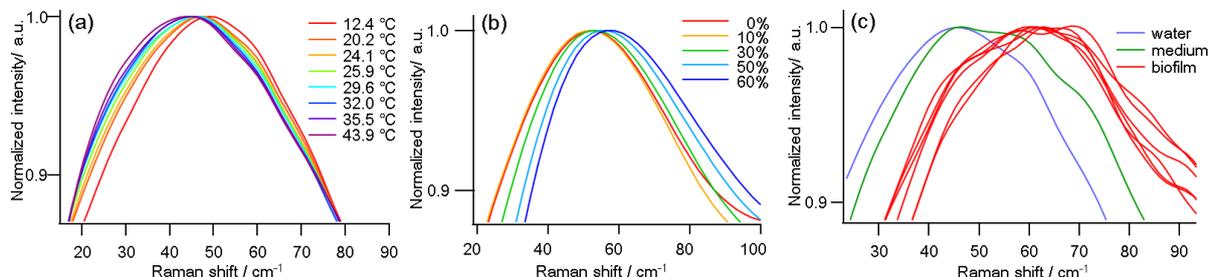


**Fig.1.** Temperature measurement of water using the present sensitivity calibration method (red) and a standard light source (green), and without any calibration (blue).

**【実験 2】** 実験 1 で測定した水の低振動数ラマンスペクトル $I_{\text{obs}}(\tilde{\nu})$ を，式(2)を用いて還元ラマンスペクトル $I_{\text{red}}(\tilde{\nu})$ に変換した (Fig. 2a)．

$$I_{\text{red}}(\tilde{\nu}) = [1 - \exp(-hc\tilde{\nu}/k_B T)](\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu})^3 I_{\text{obs}}(\tilde{\nu}) \quad (2)$$

ここで温度 $T$ として，強度比 $I_{\text{as}}/I_{\text{s}}$ の補正係数から求めた計算値を使用した．水の温度が高くなる（すなわち粘度が減少する）と $\sim 50 \text{ cm}^{-1}$ の水素結合の変角振動に帰属されるピークがレッドシフトすることが分かる．次に，温度一定の条件でスクロース水溶液の低振動数ラマンスペクトルを測定すると，その還元スペクトルは Fig. 2b のようになり， $\sim 50 \text{ cm}^{-1}$ のピークはスクロースの質量パーセント濃度が高くなり，粘度が上昇するほどブルーシフトした．BF のマトリクスは細胞外多糖で構成されているため，Fig. 2b と同様のシフトが観測されると予想される．そこで，脱窒細菌 *Paracoccus denitrificans* が形成する BF を試料として測定を行った．得られたラマンスペクトルから自家蛍光によるバックグラウンドを推定して除去し，24 °C を仮定して還元スペクトルに変換したものを Fig. 2c に示す．BF のピークは水や培地と比べてさらに高波数側にシフトしていることから，より混み合った高粘度状態であることが示唆される．



**Fig. 2.** Reduced Raman spectra (smoothed and normalized) of water at different temperatures (a), sucrose solutions at different concentrations of sucrose (b), and *P. denitrificans* BF, together with those of water and medium (c).

### 【参考文献】

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