

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19360033

研究課題名（和文） 非線形ラマンによる膜タンパク質の選択的観測

研究課題名（英文） Nonlinear Raman microscopy to detect membrane protein

研究代表者

橋本 守 (HASHIMOTO MAMORU)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授

研究者番号：70237949

研究成果の概要（和文）：

ラマンイメージングの実時間観測を目指して、多焦点非線形ラマン散乱顕微鏡を開発した。2台の ps レーザーを高精度に同期させ（ジッター 30fs）、かつ波長を 300 ms で走査可能なレーザーシステムを開発し光源に用いた。生細胞の実時間観測(100 ms/image)、レーザーアブレーションによる細胞膜の破壊とその修復過程の観測等が可能であることを示した。また、膜たんぱく質の選択的な観測を目指して、集光スポットでの電磁場の向きを自在に制御するシステムを構築し、液晶分子の配向観測によってその可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

We developed a multi-focus excitation nonlinear Raman microscope using a microlens array scanner for real-time molecular imaging. Parallel exposure of a specimen with light from two highly controlled ps mode-locked lasers (jitter of 30 fs, point-by-point wavelength scan within 300 ms) and parallel detection with an image sensor enabled real-time imaging. We demonstrated real-time Raman imaging of living cells (frame rate of 10 fps). We also combined the developed system with the laser ablation to destruct the cell membrane, and demonstrated to observe the membrane repairing process. We added the polarization pattern control system to a nonlinear Raman microscopy system to detect membrane proteins by control the direction of electro-magnetic field on the focus spot. The possibility of the selective detection of ordered molecules was confirmed with the imaging of liquid crystal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：光計測，応用分光学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎，応用工学・量子光工学

キーワード：ラマン散乱顕微鏡，非線形光学効果，振動分光学

1. 研究開始当初の背景

生きたままの生体組織・細胞を構成する分子ならびにその機能を観測する“分子イメージング”技術は、ポストゲノム研究において必要不可欠な研究ツールである。これまで、我々は CARS(coherent anti-Stokes Raman scattering)顕微鏡, 近接場 CARS 顕微鏡, 偏光分布制御 6 次元顕微鏡など, 非線形な光学現象を利用した顕微鏡の開発, ならびにそれらを用いた応用研究を行ってきた。本研究では, これらの技術を集約し, 細胞膜中にある膜タンパク質のみを可視化する, 非線形ラマン分光イメージング法の確立を目指した。

細胞は外部から様々な刺激を受けて活動をしているが, 細胞膜は, 細胞-細胞, 細胞-外界間のインターフェースとして, 最初に刺激を受ける部分である。細胞膜は主にリン脂質 2 重膜と膜タンパク質からなり, 膜タンパク質は, 情報伝達やイオン輸送等において重要な役割を担っている。特に, 市販医薬品の多くは膜タンパク質に作用するものであるといわれ, その分子構造や機能を生きたまま調べる手法の開発が望まれている。

非線形ラマン散乱分光は, 一般的に用いられている自発ラマン散乱に比べ非常に強度が大きいので, 高速なイメージングが可能となり, 生細胞等のイメージングとして有望とされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は, 非線形ラマン散乱現象を利用した顕微鏡を開発し, リアルタイムで生きた細胞の観測を可能とすること, また集光スポットの電磁場の向きを自在に制御すること, 非線形ラマン散乱分光を利用することで, 膜タンパク質の選択的観測を行うことである。

3. 研究の方法

効率よく非線形光学効果を誘起し, かつ試料へのダメージを抑えるためには, 低平均パワー, 高ピークパワーをもつ超短パルスレーザーを用いる必要がある。ただし, 観測する分子振動のスペクトル幅は数 cm^{-1} 程度であるため, これらを区別して観測するためにはレーザーにも $3\sim 5\text{ cm}^{-1}$ のスペクトル幅が要求され, フーリエ変換限界から $3\sim 5\text{ ps}$ の時間幅を持つパルスレーザーが最適となる。これらの条件を満たす光源としてピコ秒モードロックチタンサファイアレーザーの 2 台同期運転したものが挙げられる。しかしながら, 市販されているレーザー同期システムでは 2 レーザーからのパルス光間に約 1 ps の時間的

な揺らぎ(タイミングジッター)が生じてしまう。多光子過程である非線形ラマン散乱現象は, その信号強度は入射パルスの強度に依存するため 2 つのパルス光のタイミングジッターは信号の揺らぎ, つまりイメージの劣化を引き起こす。従ってタイミングジッターを fs オーダーにまで抑える必要がある。また, 非線形ラマンスペクトルを取得するためには, ω_1 光と ω_2 光の周波数差の走査が必要で, 少なくとも一方のレーザー波長を走査しなければならない。しかしながら, ピコ秒チタンサファイアレーザーの波長を走査する場合, レーザーキャビティの群速度分散が変化し, その時間幅が変わってしまう。時間幅が変わると, 非線形ラマンの発光強度も変わってしまう, 時間幅を一定にした波長走査法の開発が望まれる。

そこで, 非線形ラマン顕微鏡用に 2 台のチタンサファイアレーザーのタイミングジッター低減法の開発, 波長走査時の時間幅最適化制御をおこなった。タイミングジッター低減では, 2 光子検出器とダブルミラーペアを用いたバランス相互相関器を開発した。モードロックレーザーのパルス間隔はレーザーキャビティの間隔によって決まるので, バランス相互相関器によりフェムト秒オーダーのタイミングジッターを高精度に検出しこれをレーザーキャビティ間隔調整ヘフィードバックすることでジッターを低減した。また, 二光子検出器の出力はパルス時間幅に逆比例することから, この信号をレーザーキャビティの群速度分散補償に用いて, 時間幅を最適化する手法を開発した。専用 DSP (Digital Signal Processor) を用いることで高速 (数百 kHz サンプリング) に行い, パルス時間幅, タイミングジッターを最適化しながら, 高速に波長走査が可能なシステムを開発した。

細胞膜中に配向した膜たんぱく質を顕微鏡下で選択的に観測するために, 集光した状態で, 集光スポットでの電磁場の向きを制御するシステムの構築を行った。我々は, これまで液晶デバイスを 2 個用いることで, ピー



図 1 8 分割液晶セル (左) とこれを用いた偏光モード変換器(対物レンズに一体化)(右)

ム断面内の偏光分布を制御し、集光スポットの電磁場の向きをコントロールできることを示してきた。より、簡便に電磁場の向きを制御するために、小型な 8 分割液晶素子を用いた偏光モード変換器を開発した(図 1)。

4. 研究成果

図 2 に、開発したリアルタイム CARS 顕微鏡システムを示す。光源には、開発した高精度同期ピコ秒チタンサファイアレーザーを用いた。時間的、空間的に重ねたビームを、マクロレンズアレイによって多焦点化し、並列励起・観測を行った。

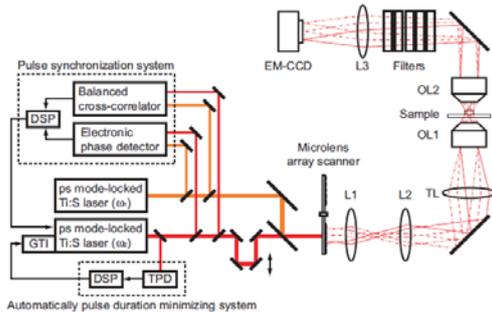


図 2 多焦点 CARS 顕微鏡システム

図 3 に、開発した装置で観測した HeLa 細胞の 3 次元像を示す。1 画像あたり 200 ms で観測した。観測ラマンシフトは、 2840 cm^{-1} と、脂質の CH_2 伸縮振動に合わせた。露光時間 200 ms でも十分な像が得られていることが分かる。なお、最高、100 ms でも生細胞のラマン画像が得られることを確認した。

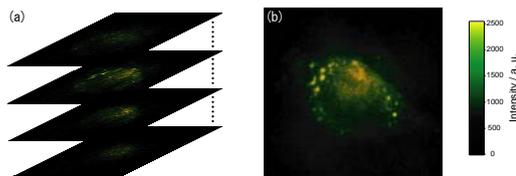


図 3 生きた HeLa 細胞のリアルタイム CARS 観測。 CH_2 伸縮振動(2840 cm^{-1})により脂質分子が可視化されている。

また、レーザーアブレーションと組み合わせ、細胞膜を破壊し、その修復過程の観測を行った。図 4 は、レーザーアブレーションによって細胞膜を破壊する前と、破壊後の CARS イメージを示している。 2840 cm^{-1} の CH_2 伸縮振動の発光強度を表すが、レーザー照射によって信号強度が上昇することが示された。これは、細胞外にある Ca^{2+} が細胞内に流入することを防ぐための防御反応である resealing が起こった結果だと考えている。 Ca^{2+} は、細胞にとって有害であるので、細胞

膜が破壊されると、 Ca^{2+} の進入を阻止しなければならない。このため、細胞が破壊されると破壊箇所には小胞が集まり、小胞同士が融合することにより穴を塞ぐ反応が起きると考えられている (McNeil ら, Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6, 499 (2005)). CH_2 伸縮振動の CARS 信号の上昇は、この小胞の集合による脂質濃度の上昇によるものだと考えている。このような研究はこれまで、細胞外に脂質と結合すると発色する蛍光色素を用いて研究が行われていた。しかしながら、この手法では、 Ca^{2+} と共に細胞内に流入した蛍光色素によって観測が行われるため、色素流入されていない箇所での小胞の動態についてはなんら情報を与えることができなかった。したがって、本手法によりアブレーション前後での小胞の動きを追跡することが可能となった。

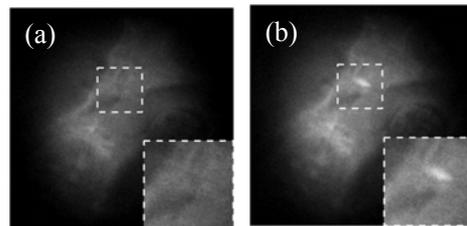


図 4 細胞膜のレーザーアブレーション前(a)後 (b)の HeLa 細胞の CARS イメージ。観測は 2840 cm^{-1} の CH_2 伸縮振動を観測

膜たんぱく質の選択的観測のために、励起光の集光スポットでの光電磁場の向きの制御を行った。膜たんぱく質は細胞膜中にあるため細胞膜のリン脂質と同様に配向する。したがって、配向した分子を選択的に観測できるかどうか、液晶分子を用いて検証した。図 5 に、小型偏光モード変換器を取り付けた CARS 顕微鏡によって得られた液晶分子の配向観測の結果を示す。試料にはスメチック液晶 8CB を使い、フォーカルコニックドメイン (FCD) を観測した。FCD では、(e) に示すように、中心では垂直な方向に分子が向いており、その周囲では放射状となっている。これを、 1608 cm^{-1} の director 方向に振動する分子振動を用いて観測した。直線偏光では(a, b)では、直線偏光の向きに平行で光軸に垂直な電界が集光スポットで主に形成される。このため、FCD 内部で液晶分子長軸が電場と並行となる円弧状の部分から強い信号が得られていることが分かる。一方、ラジアル偏光と呼ばれる放射状の偏光分布を持つ光を集光すると、集光スポットで光軸に平行(基板に垂直)な電界が形成される。このため、基板に垂直に配向した α の部分でラジアル偏光(c)が強い信号を与えた。これから、配向した分子を選択的に検出することが可能であることが示された。

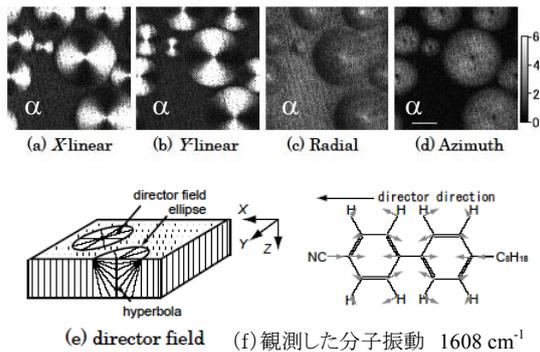


図 5 フォーカルコニッドメインの偏光分布制御 CARS 顕微鏡による観測。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① 橋本守, 南川丈夫, 新岡宏彦, 荒木勉, “リアルタイムCARS顕微鏡の開発と生細胞観測への応用”, 日本レーザー医学会誌, 査読有, 30 巻, 2010, 421-426.
- ② T. Minamikawa, T. Araki, and M. Hashimoto, “Real-time molecular imaging of organelles in living cell by multifocus excitation CARS microscope”, Proc. SPIE, 査読有, 7569 巻, 2010, 756927
- ③ M. Hashimoto, T. Minamikawa, and T. Araki, “High-speed CARS spectral imaging using acousto optic tunable filter”, Proc. SPIE, 査読有, 7569 巻, 2010, 75690Q
- ④ 南川 丈夫, 荒木勉, 橋本守, “多焦点 CARS顕微鏡によるリアルタイム分子イメージング”オプトロニクス, 査読無, 28 巻, 2009, 103-107
- ⑤ T. Minamikawa, M. Hashimoto, K. Fujita, S. Kawata, and T. Araki, “Multi-focus excitation coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy and its applications for real-time imaging”, Opt. Express, 査読有, 17 巻, 2009, 9526-9536
- ⑥ M. Hashimoto, T. Minamikawa, H. Niioka, and T. Araki, “Multifocus CARS microscopy for realtime vibrational imaging”, Proc. SPIE, 査読有, 7507 巻, 2009, 75070H
- ⑦ 橋本 守, 福島 修一郎, 安井 武史, 荒木 勉, “生体組織の無染色顕微鏡観察術”, 光アライアンス, 査読無, 20 巻, 2009, 24-28
- ⑧ T. Minamikawa, T. Araki, and M. Hashimoto, “Lipids distribution imaging of lipid vesicles by multi-focus excitation CARS microscope”, Proc. SPIE, 査読有,

7183 巻, 2009, 718328

- ⑨ M. Hashimoto, T. Minamikawa, T. Araki, K. Fujita, and S. Kawata, “Multi-focus CARS microscopy using microlens array scanner for realtime molecular spectral imaging”, Proc. SPIE, 査読有, 7183 巻, 2009, 71830R

[学会発表] (計 20 件)

- ① 高木達朗, 南川丈夫, 吉木啓介, 荒木 勉, 栗原誠, 橋本信幸, 橋本守, “偏光分布制御CARS顕微鏡による液晶の 3 次元配向イメージング”, レーザー学会学術講演会, 千里ライフサイエンスセンター, 大阪 (2010.2.4)
- ② 橋本守, 南川丈夫, 新岡宏彦, 荒木勉, “リアルタイムCARS顕微鏡による細胞の膜修復過程の観測”, レーザー学会学術講演会第 30 回年次大会, 千里ライフサイエンスセンター, 大阪 (2010.2.3)
- ③ 橋本守, “CARS顕微鏡の開発と歪み分布可視化の可能性”, 日本実験力学会ナノ材料計測分科会第 1 回研究, 兵庫県立大学書写山キャンパス (2010.1.18)
- ④ 南川丈夫, 荒木勉, 橋本守, “レーザー誘起アブレーションによる細胞の膜破壊と膜修復過程のリアルタイムCARSイメージング”, 日本光学会年次学術講演会, 朱鷺メッセ, 新潟 (2009.11.27)
- ⑤ H. Niioka, K. Ashida, K. Yoshiki, T. Araki, and M. Hashimoto, “Imaging of self-assembled monolayer on Pt substrate with radial beam excited SHG microscopy”, 平成 21 年度日本分光学会年次講演会, 東京工業大学大岡山キャンパス (2009.11.18)
- ⑥ T. Minamikawa, T. Araki, and M. Hashimoto, “Real-time CARS imaging of local disruption and reaction of living cell induced by near-infrared laser ablation”, 平成 21 年度日本分光学会年次講演会, 東京工業大学大岡山キャンパス (2009.11.17)
- ⑦ M. Hashimoto, “Realtime biomolecular imaging by multifocus CARS microscopy”, International workshop on NanoBioPhotonics, Marseille, France (2009.10.27)
- ⑧ M. Hashimoto, “High-speed non-staining biomolecular imaging by nonlinear Raman microspectroscopy”, 10th Polish-Japanese Seminar on Biomedical Engineering, Warsaw, Poland (2009.9.15)
- ⑨ 新岡宏彦, 蘆田幸一郎, 吉木啓介, 荒木勉, 橋本守, “ラジアル偏光を用いたpt基板上自己組織化分子膜の顕微増強SHGイメージング”, 第 70 回応用物理学学会学

- 術講演会, 富山大学, 富山県富山市 (2009.9.9)
- ⑩ 南川丈夫, 荒木勉, 橋本守, “多焦点CARS顕微鏡によるリアルタイム細胞イメージング”, 第70回応用物理学会学術講演会, 2009年9月9日, 富山大学, 富山県富山市
- ⑪ 南川丈夫, 荒木勉, 橋本守, “生きた細胞のリアルタイムCARSイメージング”, レーザ顕微鏡研究会 第35回講演会, 理化学研究所 和光本所 鈴木梅太郎記念ホール, 埼玉県和光市 (2009.7.14)
- ⑫ T. Minamikawa, T. Araki, and M. Hashimoto, “Multiplex multi-focus coherent anti-stokes Raman scattering microscopy”, Focus on Microscopy 2009 (FOM2009), Krakow, Poland, (2009.4.13).
- ⑬ M. Hashimoto Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy for high-speed and high-resolution bio-molecular imaging, The 8th International Conference on Nano-Molecular Electronics, Kobe (2008.12.16)
- ⑭ 南川丈夫, 秋澤康樹, 橋本守, 藤田克昌, 河田聡, 荒木勉, “リアルタイムCARS顕微鏡によるリボソームの形態変化観察”, 日本光学会年次学術講演会, 大阪大学 (2008.11.27)
- ⑮ 橋本守, “超短パルスレーザーの同期・パルス幅・偏光制御と非線形光学顕微鏡への適用”, 第7回理研・分子研合同シンポジウム エクストリームフォトンクス研究, 理化学研究所 埼玉 (2008.5.15)
- ⑯ 橋本守, “CARS顕微鏡の多焦点化によるリアルタイムイメージング”, 第48回日本生体医工学会大会, 東京都江戸川区 タワーホール船堀 (2008.4.23)
- ⑰ K. Ashida, K. Yoshiki, and T. Araki, “Second harmonic generation imaging of self-assembled monolayers by radially polarized beam excitation”, Focus on Microscopy 2008 (FOM2008), Awaji (2008.4.15).
- ⑱ T. Minamikawa, M. Hashimoto, K. Fujita, S. Kawata, and T. Araki, “Realtime imaging of lipid bilayer vesicle with multi-focus CARS microscope”, Focus on Microscopy 2008 (FOM2008), Awaji (2008.4.14)
- ⑲ T. Minamikawa, M. Hashimoto, K. Fujita, S. Kawata, and T. Araki, “Real-time CARS imaging using microlens array”, 平成19年度 日本分光学会年会, 東京工業大学 (2007.11.13)
- ⑳ 橋本守, “リアルタイムCARSイメージング”, 平成19年度 日本分光学会 顕微分光部会シンポジウム, 東京大学 (2007.10.27)

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 井上康志, 川田善正, 渡慶次学, 橋本守, 火原彰秀, 講談社サイエンティフィック, “顕微分光法 ナノ・マイクロの世界を見る分光法”, 2009, 55-76

〔その他〕

ホームページ等

http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp/~araki_1ab

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 守 (HASHIMOTO MAMORU)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授
研究者番号：70237949

(2) 研究分担者

福島 修一郎 (FUKUSHIMA SHUICHIRO)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号：40362644

藤田 克昌 (FUJITA KATSUMASA)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：80362664

吉木 啓介 (YOSHIKI KEISUKE)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：60432548

(3) 連携研究者

()

研究者番号：