

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871127

研究課題名(和文) 深紫外共鳴ラマン散乱を用いた細胞内核酸分布分析

研究課題名(英文) Deep-UV resonance Raman scattering for nucleotide distribution imaging of cells

研究代表者

熊本 康昭 (Kumamoto, Yasuaki)

独立行政法人理化学研究所・光量子工学研究領域・特別研究員

研究者番号：30611727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：核酸分子の深紫外光劣化を抑制する方法と、核酸分子の深紫外ラマン散乱を少ない光照射量で励起・検出する方法を開発した。希土類イオンと不活性ガスが核酸分子の深紫外光劣化を抑制することを見出した。液体窒素冷却が核酸分子の深紫外光劣化を抑制する可能性も示した。試料への光照射量を減らすためには、高検出効率の深紫外ラマン顕微鏡を開発した。さらに、インジウムによる深紫外ラマン散乱増強法も確立した。開発した顕微鏡と光劣化抑制法により、高信号対雑音比での細胞内核酸分布の観察を実現した。細胞内核酸を構造で識別して観察する方法も検討し、細胞内核酸を非染色で分布分析する新たな道を拓いた。

研究成果の概要(英文)：I developed methods to suppress photodegradation of nucleotides under deep-ultraviolet (DUV) exposure and methods to measure DUV Raman scattering of nucleotides with low exposure doses. Lanthanide ions and the argon gas suppressed the DUV photodegradation of nucleotides. Liquid nitrogen cooling showed the potential to suppress the DUV photodegradation of nucleotides. In order to reduce the exposure dose of a specimen for measuring DUV Raman scattering, DUV Raman microscope with a high detection efficiency has been developed. Additionally, DUV Raman scattering enhancement by indium has been established. The microscope and the photodegradation suppression methods realized nucleotides distribution imaging of a cell with a high signal-to-noise (SN) ratio. Taking the advantages of the high SN ratio, methods to identify intracellular nucleotides by their structures have been discussed. This study has led the way to measure intracellular nucleotides without any labeling technique.

研究分野：応用物理学

キーワード：深紫外共鳴ラマン散乱 深紫外ラマン顕微鏡 細胞内核酸分子 紫外光劣化の抑制 希土類イオン 不活性ガス 液体窒素冷却 表面増強ラマン散乱

1. 研究開始当初の背景

ラマン顕微鏡は、分子を構造により識別できるので、細胞内生体分子の分布を非染色で観察できる。ラマン顕微鏡による生体分子イメージングは、1993年の最初の報告以来、可視・近赤外域での励起・観察に限定されていたが、近年、深紫外域(波長 200-300nm)での励起・観察が実現された。深紫外光を用いれば、共鳴ラマン効果により、核酸塩基を選択的に計測できる。しかし、深紫外ラマン顕微鏡では、分子の光劣化により、高信号対雑音比、高解像度での細胞内核酸分子イメージングは困難である。低い信号対雑音比のために、種々の塩基、構造の異なる核酸のスペクトルを識別できない。低い解像度のために、異なる塩基や構造を有する核酸の空間分布の違いを可視化することはできない。

2. 研究の目的

本課題では、深紫外ラマン顕微鏡による核酸分子イメージングにおいて、深紫外光による細胞内生体分子の劣化を軽減し、核酸塩基の共鳴ラマンスペクトルを高信号対雑音比、高解像度で計測する手法の確立を目指した。さらに、高信号対雑音比での測定により、異なる塩基や立体構造を有する核酸を非染色で識別し、その細胞内分布を可視化することを目指した。

3. 研究の方法

深紫外光による細胞内生体分子の劣化を軽減するために、

- 1) 生体分子の紫外光劣化の抑制
- 2) 励起光焦点の整形による照射領域の局在に取り組んだ。

少ない深紫外光照射量で効率良く生体分子のラマン散乱を励起するために、

- 3) 深紫外ラマン散乱顕微鏡の検出効率向上
- 4) 生体分子のラマン散乱能の増大に取り組んだ。

核酸の塩基や立体構造を識別するために、

- 5) 純物質のスペクトルの比較
- 6) スペクトル解析による微弱信号抽出
- 7) 溶媒効果によるスペクトル分離
- 8) 偏光測定によるスペクトル分離に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 希土類イオンによる細胞内生体分子の深紫外光劣化の抑制 (**Y. Kumamoto, K. Fujita, N. Smith, S. Kawata, "Lanthanide ions for suppressing molecular photodegradation in cells under deep-UV exposure," submitted.**)

希土類イオンであるテルビウムイオン (Tb^{3+})、ユーロピウムイオン (Eu^{3+})、トリウム

イオン (Tm^{3+}) が細胞の深紫外光劣化を抑制することを見出した。図 1 は、深紫外光 ($\lambda=257nm$) 照射前後で測定した HeLa 細胞の明視野顕微鏡画像である。細胞に Tb^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} を導入した場合、深紫外光照射による細胞形状の変化が抑制された。図 2 は、深紫外 ($\lambda=257nm$) 共鳴ラマン散乱により測定した HeLa 細胞内の核酸塩基(アデニン、グアニン)の分布を示す。 Tb^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} を導入した細胞では、核酸塩基のラマン信号を多く得られた。 Tb^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} がラマン散乱効率を増強しないことも確認して、 Tb^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} が核酸塩基の劣化を抑制したと結論付けた。 Tb^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} による生体分子の深紫外光劣化の抑制は、励起された分子から Tb^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} へのエネルギー移動に起因すると考えられる。

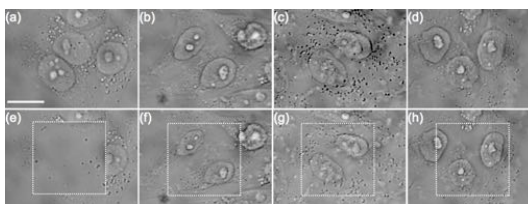


図 1 : 深紫外光 ($\lambda=257nm$) 照射の (a-d) 前と (e-h) 後で測定した HeLa 細胞の明視野顕微鏡画像。(a, e) は希土類イオンを導入していない細胞。(b, f), (c, g), (d, h) はそれぞれ Tb^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} を導入した細胞。スケールバーは $15\mu m$ 。点線は、深紫外照射領域を示す。

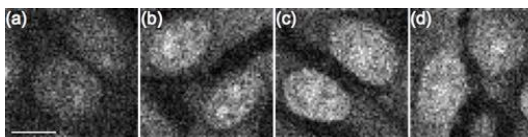


図 2 : 深紫外 ($\lambda=257nm$) 共鳴ラマン散乱により測定した HeLa 細胞内の核酸塩基の分布。(a) は希土類イオンを導入していない細胞。(b), (c), (d) はそれぞれ Tb^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} を導入した細胞。スケールバーは $15\mu m$ 。(a-d) は、同じ明るさとコントラストで表示。

希土類イオンだけでなく、アルゴンガスも細胞内生体分子の深紫外光劣化を抑制するがわかった。図 3 は、アルゴンガスにより脱気した細胞の明視野顕微鏡画像と深紫外ラマン散乱画像である。希土類イオンもアルゴンガスもない場合(図 1 (a, e) と図 2 (a)) との比較により、アルゴンガスが細胞形状の変化と核酸塩基の劣化を抑制したと結論付けた。アルゴンガスによる細胞内生体分子の深紫外光劣化の抑制は、生体分子の酸化抑制によるものと考えられる。

希土類イオンとアルゴンガスを同時に利用することにより、細胞内生体分子における深紫外光劣化の抑制の効果が増大することもわかった。生体分子の劣化の抑制により、高信号対雑音比と高解像度での深紫外ラマンイメージング測定が可能になった(図 4)。信号対雑音比の改善は、希土類イオンとアル

ゴンガスを利用しない場合に比べて、4.5 倍であった。高信号対雑音比、高解像度での測定を可能にした本成果は、深紫外ラマン顕微鏡を高感度化、高分解能化し、精密な生体分子分布分析を実現するものである。

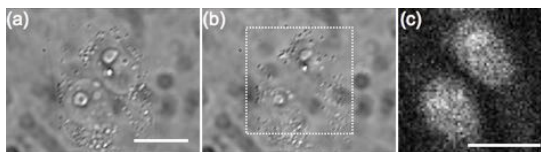


図 3 : アルゴンガスにより脱気した細胞の (a, b) 深紫外光 ($\lambda = 257\text{nm}$) 照射前後の明視野顕微鏡画像と (c) 深紫外ラマン散乱画像。ラマン画像は、図 2 と同じ明るさとコントラストで表示。スケールバーは $15\mu\text{m}$ 。点線は、深紫外照射領域を示す。

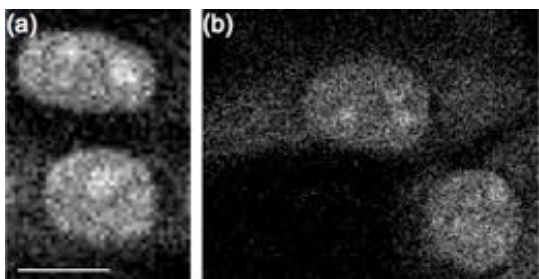


図 4 : 希土類イオンを導入し、アルゴンガスにより脱気した HeLa 細胞の深紫外ラマン散乱画像。(a) 長い露光時間で得られた高信号対雑音比の画像と (b) 短い走査ステップで得られた高解像度の画像。

(2) 低温冷却による分子の紫外光劣化の抑制 (Yoshino, et al., Anal. Sci. (2015).)

液体窒素冷却が、紫外光照射下の有機分子の劣化を抑制することを見出した。有機分子として、波長 360nm に吸収スペクトルの極大を有するバクテリオクロフィルを用いた。図 5 は、波長 355nm 励起のバクテリオクロフィル分子膜の共鳴ラマンスペクトルである。液体窒素冷却下 (80K) では、 1287cm^{-1} 、 1343cm^{-1} 、 1530cm^{-1} 、 1611cm^{-1} に、バクテリオクロフィル分子由来のラマンバンドが高強度で計測された。常温 (300K) では、バクテリオクロフィル分子由来のラマンバンドの強度は低く、紫外光吸収による分子変性が観察された。分子の劣化と温度との関係を観察するために、紫外光照射による分子の継時劣化の温度依存性を測定した。 300K 、 200K 、 150K 、 80K で測定した結果、冷却温度が低いほど、分子の紫外光劣化が抑制されることがわかった (図 6)。

低温冷却によって分子の紫外光劣化を抑制した本成果は、生体分子の深紫外光劣化の低温冷却による抑制効果も示唆するものであり、希土類イオンとアルゴンガスとの組み合わせによる生体分子の深紫外光劣化抑制の効果を増大する道を拓いた。

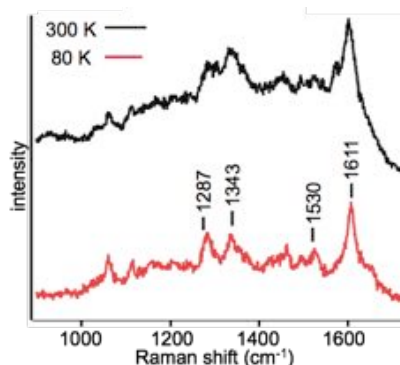


図 5 : 波長 355nm 励起のバクテリオクロフィル分子膜の共鳴ラマンスペクトル。

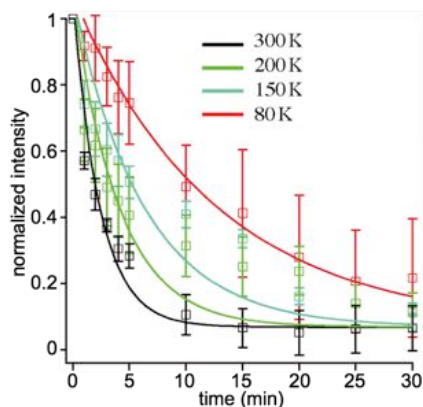


図 6 : バクテリオクロフィルの波長 355nm 励起ラマン散乱強度の継時変化。 300K 、 200K 、 150K 、 80K で測定。

(3) 深紫外ラマン散乱顕微鏡における検出効率の向上、及び励起光焦点の整形による照射領域の局在

図 7 に、開発した深紫外ラマン散乱顕微鏡の光学系を示す。励起光焦点の崩れによる試料照射領域の拡大を防ぐために、励起光の波面整形を行なった。入射光学系にピンホールを導入し、励起光ビームの強度分布を均一にした。検出効率を向上するためには、反射率 99% の誘電体多層膜ミラーを検出系に必要な最小数だけ用いた。レンズには、反射防止コーティングを施し、透過率が 96% 以上にした。ラマン散乱光と励起光の分離には、高透過率 (90%) のビームスプリッターを用いた。分光器、検出器、エッジフィルターは、それぞれ現存する最大の回折効率、量子効率、透過率を有する製品を選定した。対物レンズは、高検出角を有する NA1.35 のものを利用した。

(4) 核酸塩基の深紫外共鳴ラマン散乱増強 (Kumamoto, et al., ACS Photonics (2014).)

核酸塩基の深紫外共鳴ラマン散乱がインジウムにより増強することを見出した。図 8 は、アデニン薄膜の深紫外 ($\lambda = 266\text{nm}$) 共鳴ラマン散乱スペクトルである。アデニン薄膜のラマン散乱強度は、インジウム・ナノ粒子構造により 11 倍増強した。インジウムは、水

中で安定であるので、細胞内核酸分子の深紫外共鳴ラマン散乱の増強における応用が期待できる。本成果は、細胞内核酸の低照射量での高感度観察の可能性を拓いた。

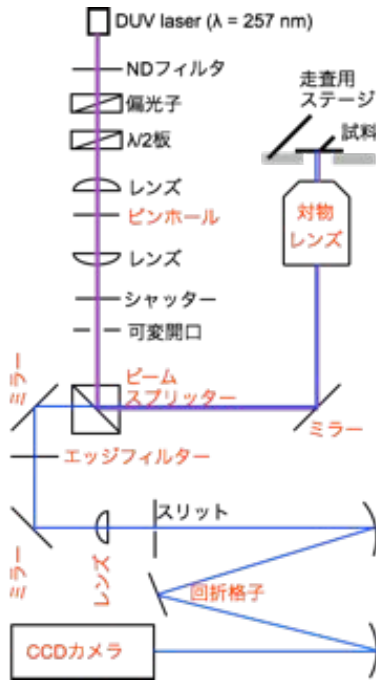


図 7 : 開発した深紫外ラマン散乱顕微鏡

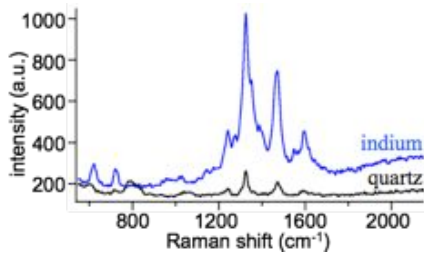


図 8 : アデニン薄膜の深紫外 ($\lambda=266\text{nm}$) 共鳴ラマン散乱スペクトル。インジウム・ナノ粒子構造上と合成石英基板上で測定。

(5) 深紫外共鳴ラマン散乱による細胞内核酸立体構造の識別可能性の検討

深紫外共鳴ラマン散乱により、DNA と RNA が識別可能であることを見出した。図 9 に、DNA と RNA の水溶液の深紫外 ($\lambda=257\text{nm}$) 共鳴ラマン散乱スペクトルを示す。DNA では 1209cm^{-1} 、 1394cm^{-1} 、 1674cm^{-1} に、RNA では 1247cm^{-1} に、それぞれ特異的なラマンバンドがあることがわかった。RNA では、 1342cm^{-1} 、 1502cm^{-1} 、 1592cm^{-1} のラマンバンド強度が相対的に強いこともわかった。この結果は、深紫外共鳴ラマン散乱により細胞内の DNA と RNA を識別できる可能性を示唆するものである。

DNA と RNA の深紫外共鳴ラマン散乱スペクトルの違いに着目し、細胞内の DNA と RNA の識別を試みた。まず、細胞内の DNA と RNA の分布を理解するために、細胞内の DNA と RNA

をそれぞれ NucBlue と SytoRNA で染色し、蛍光観察を行なった。その結果、RNA は核小体に局在しつつ核質と細胞質にも存在する一方で、DNA は核質にのみ局在することがわかった (図 10 (a, b))。蛍光観察した細胞を Eu^{3+} とアルゴンガスとで処理し、深紫外共鳴ラマン散乱イメージングを行なった。散乱強度が強い波数 1502cm^{-1} に対応するラマンバンドの強度分布を解析した結果、RNA の蛍光画像と類似した分布が得られた (図 10 (c))。図 9 で示した通り、波数 1502cm^{-1} は、RNA の寄与が DNA より大きいので、RNA の分布を強調した可能性がある。

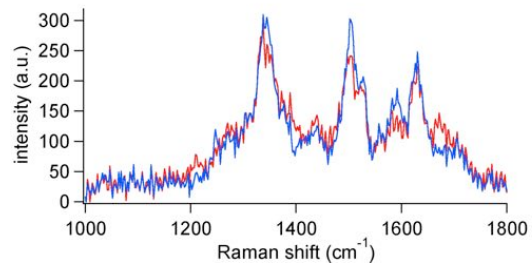


図 9 : DNA と RNA の水溶液の深紫外 ($\lambda=257\text{nm}$) 共鳴ラマン散乱スペクトル。赤線は DNA、青線は RNA の測定結果。

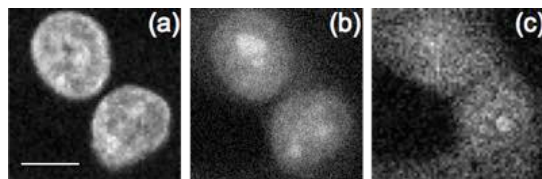


図 10 : (a)DNA と (b)RNA の染色蛍光の強度分布。(c) 1502cm^{-1} に対応する細胞のラマンバンドの強度分布。スケールバーは $10\mu\text{m}$ 。

DNA と RNA で観察された特異的なバンドに対応する波数の強度分布も分析したが、信号対雑音比が低く、DNA、もしくは RNA の蛍光画像のような分布は観察されなかった。

深紫外共鳴ラマン散乱による細胞内の DNA と RNA の正確な識別には、さらに信号対雑音比を改善する必要がある。

細胞内の DNA と RNA とを識別するために、スペクトル分離における溶媒効果の有用性を検証した。DNA と RNA の重水溶液の深紫外共鳴ラマンスペクトルの強度比を測定し、水溶液中の結果と比較した (図 11)。比較の結果より、DNA と RNA の強度比スペクトルの値の範囲は、信号を含む波数範囲 $1200\text{--}1750\text{cm}^{-1}$ において、重水溶液では水溶液に比べて狭いことがわかり、重水の溶媒効果が DNA と RNA のスペクトルの識別に有効でないことがわかった。

DNA と RNA のスペクトル分離における深紫外共鳴偏光ラマン測定の実用性も検証した。DNA と RNA の水溶液それぞれの深紫外共鳴偏光ラマン測定で検出した直交偏光成分の強度比を比較した (図 12)。結果より、DNA と RNA のいずれの強度比スペクトルも測定ス

クトルと同じ形状であり、さらに、DNA と RNA とで強度比スペクトルの値に差がないことがわかり、深紫外共鳴偏光ラマン測定も DNA と RNA のスペクトルの識別に有効でないことがわかった。

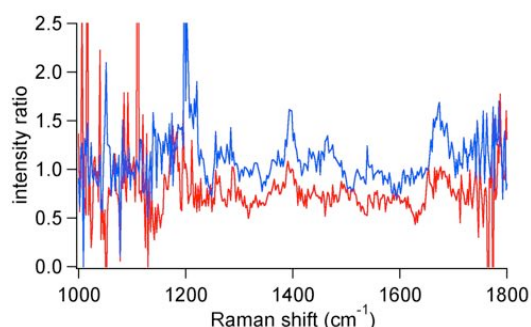


図 1 1 : DNA と RNA の深紫外共鳴ラマンスペクトルの強度比 (DNA/RNA)。赤線は重水溶液中、青線は水溶液中の測定結果。

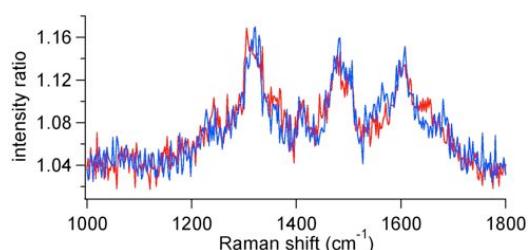


図 1 2 : 深紫外共鳴偏光ラマン測定で検出された直交偏光成分の強度比。赤線は DNA、青線は RNA の測定結果。

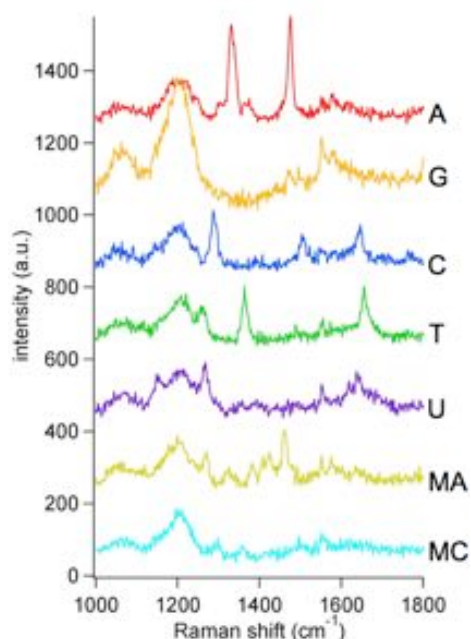


図 1 3 : 核酸塩基水溶液の深紫外 ($\lambda=257\text{nm}$) 共鳴ラマンスペクトル。A, G, C, T, U, MA, MC はそれぞれ、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、メチル化アデニン、メチル化シトシン。1050 cm^{-1} と 1200 cm^{-1} のバンドは、合成石英基板のラマンバンド。

(6) 深紫外共鳴ラマン散乱による細胞内核酸塩基の識別可能性の検討

深紫外共鳴ラマン散乱により、核酸塩基が識別可能であることを見出した。図 1 3 に、核酸塩基の水溶液の深紫外 ($\lambda=257\text{nm}$) 共鳴ラマン散乱スペクトルを示す。それぞれの塩基が異なるスペクトルを示した。また、異なる波数に特異的なラマンバンドを示した。この結果は、深紫外共鳴ラマン散乱により細胞内の核酸塩基を識別できる可能性を示唆するものである。細胞内の核酸塩基の分布分析には、信号対雑音比を改善する必要がある

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 2 件)

(1) 原著論文 (計 2 件)

[1] H. Yoshino, Y. Saito, Y. Kumamoto, A. Taguchi, P. Verma, S. Kawata, "Temperature dependent photodegradation in UV-resonance Raman spectroscopy," Anal. Sci. 31, 451-454 (2015). 査読あり。
DOI: 10.2116/analsci.31.451

[2] Y. Kumamoto, A. Taguchi, M. Honda, K. Watanabe, Y. Saito, S. Kawata, "Indium for deep-ultraviolet surface-enhanced resonance Raman scattering," ACS Photonics 1, 598-603 (2014). 査読あり。
DOI: 10.1021/ph500076k

〔学会発表〕 (計 15 件)

招待講演 (計 3 件)

[1] 熊本康昭, "深紫外顕微鏡," 日本分光学会第 51 回夏季セミナー「超解像顕微鏡と分光イメージング」, 2015 年 9 月 3 日 (幕張メッセ, 千葉).

[2] 熊本康昭, 齊藤結花, 田口敦清, 本田光裕, 河田聡, "深紫外プラズモニクスにおけるインジウムとアルミニウムの利用," 第 62 回応用物理学会春季学術講演会, 2015 年 3 月 11 日 (東海大学, 神奈川).

[3] Y. Kumamoto, A. Taguchi, N. Smith, S. Kawata, "Deep-ultraviolet resonance Raman spectroscopy for biomolecular imaging and analysis in cells," The 44th Winter Colloquium on the Physics of Quantum Electronics (PQE-2014), 2014 年 1 月 7 日 (Snowbird, USA).

その他の講演 (計 12 件)

[1] Y. Kumamoto, Y. Saito, A. Taguchi, M. Honda, K. Watanabe, S. Kawata, "Indium for

deep-UV plasmonics: Surface-enhanced Raman scattering," JSAP-OSA Joint Symposia 2014, 2014年9月20日(北海道大学, 北海道).

[2] Y. Kumamoto, Y. Saito, A. Taguchi, M. Honda, K. Watanabe, S. Kawata, "Indium for deep-ultraviolet surface-enhanced resonance Raman scattering," The 14th International Conference of Raman Spectroscopy (ICORS2014), 2014年8月15日(Jena, Germany).

[3] 熊本康昭, 田口敦清, 本田光裕, 齊藤結花, 河田聡, "深紫外ナノフォトニクス・バイオフォトニクス," 理研シンポジウム 第2回「光量子工学研究」, 2014年11月26日(仙台市情報・産業プラザ, 宮城).

[4] 熊本康昭, 河田聡, "深紫外バイオイメージングにおける光化学ダメージの抑制," 理研シンポジウム 第2回「光量子工学研究」, 2014年11月25日(仙台市情報・産業プラザ, 宮城).

[5] 熊本康昭, 齊藤結花, 田口敦清, 本田光裕, 渡邊晃一, 河田聡, "インジウムを用いた深紫外表面増強共鳴ラマン散乱," 日本分光学会年次講演会, 2014年5月28日(理化学研究所, 埼玉).

[6] 熊本康昭, 田口敦清, スミスニコラス, 河田聡, "深紫外共鳴ラマン分光顕微鏡を利用した細胞内生体分子イメージング," 日本分光学会年次講演会, 2013年11月19日(大阪大学, 大阪).

[7] 熊本康昭, 田口敦清, 齊藤結花, 河田聡, "細胞の深紫外共鳴ラマン散乱イメージング," 理研シンポジウム 第1回「光量子工学領域研究」, 2013年10月31日(理化学研究所, 埼玉).

[8] H. Yoshino, Y. Saito, Y. Kumamoto, P. Verma, S. Kawata, "Low temperature UV resonance Raman spectroscopy," UV-DUV Plasmonics and Nanophotonics Workshop (UPN2013), 2013年10月28日(大阪大学, 大阪).

[9] Y. Kumamoto, A. Taguchi, N.I. Smith, S. Kawata, "Deep UV resonance Raman microscopy and spectroscopy for biomolecular imaging of a cell," UV-DUV Plasmonics and Nanophotonics Workshop (UPN2013), 2013年10月28日(大阪大学, 大阪).

[10] H. Yoshino, Y. Saito, Y. Kumamoto, P. Verma, S. Kawata, "Low temperature UV resonance Raman spectroscopy," The 7th International Conference of Advanced

Vibrational Spectroscopy (ICAVS-7), 2013年8月26日(神戸国際会議場, 兵庫).

[11] Y. Kumamoto, A. Taguchi, N.I. Smith, S. Kawata, "Deep UV resonance Raman microscopy for nucleotide imaging of a cell," The 7th International Conference of Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS-7), 2013年8月26日(神戸国際会議場, 兵庫).

[12] 熊本康昭, 田口敦清, スミスニコラス, 河田聡, "深紫外ラマン散乱顕微鏡を用いた細胞内生体分子分析" レーザー顕微鏡研究会, 2013年7月31日(理化学研究所, 埼玉).

〔図書〕(計1件)

[1] Y. Kumamoto, "Deep-ultraviolet microscopy and microspectroscopy," in *Far- and deep-ultraviolet spectroscopy*, eds. Y. Ozaki and S. Kawata (Springer Tokyo, 2015, in press).

〔その他〕

http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/publication_j.html

<http://kumamotopublish.blogspot.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊本 康昭 (KUMAMOTO, Yasuaki)
独立行政法人理化学研究所・光量子工学研究領域・特別研究員
研究者番号: 30611727