

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：14603
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K06163
研究課題名(和文) 逆ラマン分光法による無標識で化学種特定可能な高速細胞イメージングシステム開発

研究課題名(英文) Development of the rapid cell imaging system which can identify the chemical species without labeling by inverse Raman spectroscopy

研究代表者
中島 聡 (Nakashima, Satoru)
奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・URA (チーフ)

研究者番号：80263234
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：基礎データとして、単一の検出素子による光学系を構築して、その上で本システムによる検出限界のレベルについてデータを取得した。顕微光学系を構築し同軸で二色の光を入射し、数十 μm の領域が観測できるような配置で検出を行った。光学系の精密設計などにより、ほぼリアルタイム(2秒)で0.06%以下の強度変化を検出できる単一チャンネルの逆ラマン顕微装置を開発できた。この装置を用いて、脂質のモデル物質として水溶液中の油滴を用いた試料の本逆ラマン測定システムによる顕微観察に成功した。そこで単一素子をCMOS型超高速二次元検出器に置き換え、イメージング型の逆ラマン顕微鏡を目指して光学系置換を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
細胞内のタンパク質や小分子の分布、特にその動的過程は細胞の機能を調べる上で非常に重要である。生きた細胞を非侵襲、非標識で直接観測することができれば極めて有効な手段となる。ラマン分光法は原理的にはこのような目的には最適であるが、感度が低くまた積算時間がかかることが壁となってきた。近年格段に進歩してきた、高繰り返しレーザと高速検出器を活用して、逆ラマン分光法という非線形現象を利用することで、これらの難点を克服できると考え研究を進めた。細胞内の生命現象をライブで捉えて観察できることは、細胞生物学のステージを上げることに繋がり、がん細胞の形成過程など疾病治療への道も開ける。

研究成果の概要(英文)：As basic data, I constructed an optical system with a single detection element, and then acquired data on the detection limit level of this system. A microscopic optical system was constructed, and two colors of light were incident coaxially, and detections were performed in an arrangement that allows observation of a region of several tens of micro meter. Through the precise design of the optical system, I was able to develop a single-channel inverse Raman microscope that can detect intensity changes of 0.06% or less in near real time (2 seconds). Using this device, I succeeded in microscopic observation of a sample using oil droplets in an aqueous solution as a model substance for lipids by this reverse Raman measurement system. In the next step, I replaced a single element with a CMOS-type ultra-high-speed two-dimensional detector, and replaced the optical system with the aim of creating an imaging-type inverse Raman microscope.

研究分野：生体分子光学

キーワード：ラマン顕微鏡 逆ラマン現象 ポンププローブ法 二次元検出器 リアルタイム 細胞ダイナミクス
小分子 非染色・非侵襲

1. 研究開始当初の背景

細胞や組織の中の生体分子を可視化する手法としては、蛍光標識を用いた蛍光イメージング法が一般的であり、非常に盛んに研究が行われている。しかし、固定化・標識化などの前処理が必要であることや、蛍光標識分子が生体分子本来の機能を阻害する可能性があることが問題となるなど、原理的な制約がどうしても避けられない。一方、ラマン分光法は、分子振動を通して、分子種を同定するほか、詳細な構造や酸化状態、基質結合状態などの分子の状態を調べることができる手法であり、原理的にはどのような生体分子も検出する。この原理を応用したラマンイメージング法は、非染色・無標識で細胞や組織内の生体分子をイメージングでき、更には分子の状態も知ることができるため、次世代のイメージング法として期待されている。通常ラマン分光法は、分子に光を当てて発生する微弱なラマン散乱光を検出する手法であり、生理的な濃度である μM レベルの生体分子を測定するためには最低でも数十秒程度の積算時間を要する。ラマン顕微分光法では更に、観測したい視野(画素数)分だけこの積算を繰り返す必要があるため、測定によっては一枚の画像を撮影している間に細胞の状態が変化してしまうという問題があった。従って現在開発されているラマン顕微鏡は、分子種の同定ではなく、比較的強いシグナルを用いて脂質・タンパク質・DNA といった巨大分子の分類を特定するために使われていることがほとんどである (Xie et al., Science, 2015)。そこでこれまで、高速かつ高感度なラマン顕微鏡の開発を目指して、非線形ラマン現象を用いた CARS 顕微鏡 (Zumbusch et al., Phys. Rev. Lett., 1999)・誘導ラマン(逆ラマン)顕微鏡 (Itoh et al., Nature photon, 2009) など、様々なラマン顕微鏡が開発され、その性能は日々進化している。しかし、これらの多くは原理上、一点に集光した入射光(例えば $1 \mu\text{m}^2$)を走査して二次元像(例えば $50 \times 50 \mu\text{m}$)を得るスキャン型である。細胞に損傷を与えず、かつ高解像度な像を高速で得るためには、積算時間をできるだけ短くする必要があるが、これには限界がある。生理的濃度の生体分子を無標識でリアルタイムにイメージングすることが出来るようなラマン顕微分光法を確立するために、微弱なラマンシグナルを高感度かつ高速で捉えることが出来る、従来にはないアイデアと原理に基づいた新たな顕微システムを開発する必要がある。

2. 研究の目的

そこで本研究では、高感度・高速ラマン測定可能な「逆ラマン過程」と「共鳴ラマン効果」を利用し、ありのままの細胞や組織をリアルタイムにイメージングすることができる新規ラマン顕微鏡を開発することを目的とする。こうした目的を達するために、①微弱なラマンシグナルを増大することができる光学現象を利用し、②高速でシグナルを取り込むことが出来るように光学系を構築する。

3. 研究の方法

逆ラマン過程とは、右図に示すように分子に入射した二色の光の振動数の差($\omega_1 - \omega_2$)が分子の振動数と一致した時($\Delta v = 1$)に、入射光の強度が変調されるという現象であり、プローブ光の強度変化として捉える。この現象は誘導過程による光強度変調として検出できるため、従来用いられてきた自発ラマンよりも三桁ほど大きなラマン信号を与える。また、逆ラマンと同様の光学過程である CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy) では、感度は同

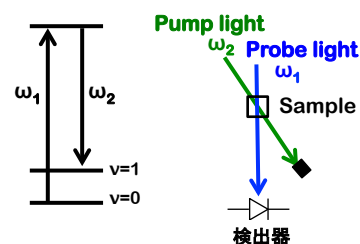
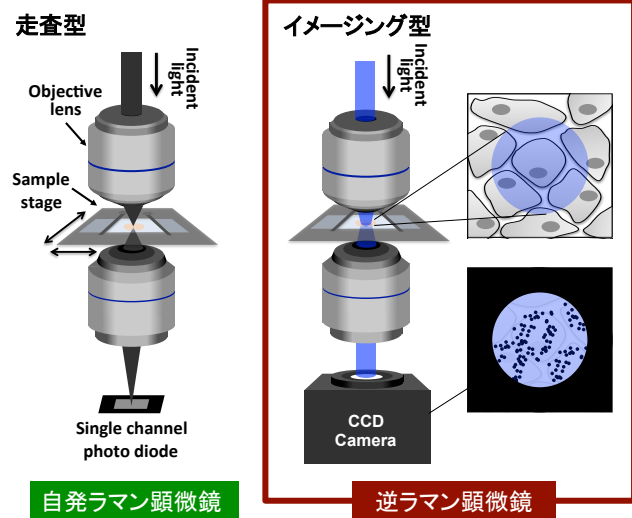


図1.逆ラマン過程のダイアグラムと検出方法

程度であるものの特定方向の非線形光を検出するため撮像の際に集光点を走査する必要がある。一方逆ラマンでは、試料を透過した入射光の強度の変化を観測するため、透過型光学顕微鏡と同様の光学系を用いて像自体の逆ラマン信号を検出（検出器を面に）できれば、撮像時間を劇的に短縮することができる（ 100×100 pixel の画像であれば走査する場合と比較して1万分の1）。ごく最近になって、高速(>1kHz)かつ高分解能(16bit)で像を読み出すことができるカメラの開発が進んでいる点に着目し、入射光を集光せず、試料からの透過光をカメラで直接撮影するイメージング型の逆ラマン顕微鏡を開発する。次に、共鳴ラマン効果とは、入射光の波長が分子の電子吸収帯に接近すると、その分子のラマンシグナルが数桁以上増大する効果である。入射光(ω_1)の波長を標的分子の電子吸収帯に近づけると、標的分子のラマンシグナルだけを選択的に増大できる。この手法を用いれば、同時に全ての画素の増強されたラマン信号を得ることができるため、撮像時間が大幅に短縮できる。

4. 研究成果

全てのシステムの基礎となるデータとして、単一の検出素子による光学系を構築して、その上で本システムによる検出限界のレベルについてデータを取得した。顕微光学系を構築し同軸で二色の光を入射し、面で検出するためにあえて励起光を defocus させて数十 μm の領域が観測できるような配置にして検出を行った。検出には励起光を変調させて検出光信号強度変化を測定するため、(同期して変調される)励起光の漏れ光が最大のノイズとなりうる。光学系の精密設計によるノイズ除去や、



コンピュータアルゴリズムにロックイン検波を行う解析プログラムの開発により、リアルタイムで 0.06%以下の強度変化を検出できる単一チャンネルの逆ラマン顕微装置を開発できた。現状でも1素子・1波長あたり2秒でのこの精度での検出が可能である。この条件は、波長選択やアルゴリズムの現物に合わせた最適化、さらには光学系の改良によりさらに向上させることができることも確認した。この装置を用いて、脂質のモデル物質として水溶液中の油滴を用いた試料の本逆ラマン測定システムによる顕微観察に成功した。そこで単一素子を CMOS 型超高速二次元検出器に置き換え、イメージング型の逆ラマン顕微鏡を目指して光学系置換を行った。逆ラマン光検出のための励起用のレーザは 1kHz の高繰り返しのものである。励起光を変調させるために、チョッパーにより周波数を 500Hz に落とし、超高速二次元検出器との同期を図った。これは 16bit の深度で 128×128 pixel の画像を得ることができる。単一検出素子の場合、24bit の超高速 ADC(1.5MHz)によりデータ取得を行い、平滑化することで SN の向上を図ったが、現在 commercial に入手可能な検出器としては最高の性能であり、今後は読み込み速度の律速である ADC のさらなる超高速化が望まれる。残念ながら、コロナの影響により前任地(兵庫県立大)との往来が制限されてしまい、研究体制が分断されてしまったため実験遂行のいくつかが困難となった。基本的なシステムの完成は見たものの、そのラマン像の評価検証の段階は予備実験にとどまっており、最終的な逆ラマン顕微鏡の完成の一手手前の段階にとどまってしまった。今後はその検証を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawahara-Nakagawa Yuka, Nishikawa Koji, Nakashima Satoru, Inoue Shota, Ohta Takehiro, Ogura Takashi, Shigeta Yasuteru, Fukutani Katsuyuki, Yagi Tatsuhiko, Higuchi Yoshiki	4. 巻 28
2. 論文標題 New assay method based on Raman spectroscopy for enzymes reacting with gaseous substrates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 663 ~ 670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen Li, Tatsuhito Nishiguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura, Satoru Nakashima	4. 巻 1859
2. 論文標題 Performance of a time-resolved IR facility for assessment of protonation T states and polarity changes in carboxyl groups in a large membrane protein, mammalian cytochrome c oxidase, under turnover conditions in a sub-millisecond time resolution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta	6. 最初と最後の頁 1045-1050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2018.05.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuka Kawahara-Nakagawa, Koji Nishikawa, Satoru Nakashima, Shota Inoue, Takehiro Ohta, Takashi Ogura, Yasuteru Shigeta, Katsuyuki Fukutani, Tatsuhiko Yagi, and Yoshiki Higuchi	4. 巻 28
2. 論文標題 New assay method based on Raman spectroscopy for enzymes reacting with gaseous substrates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 663-670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中島聡、Li Chen、伊藤（新澤）恭子、小倉尚志、吉川信也
2. 発表標題 時間分解赤外分光法解析によるシトクロム酸化酵素の反応中間体プロトン移動機構
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoru Nakashima, Chen Li, Tatsuhito Nishiguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura
2. 発表標題 Proton Pumping Dynamics during Catalytic Cycle in Cytochrome c Oxidase Revealed by Time-Resolved IR Spectroscopy
3. 学会等名 10th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoru Nakashima
2. 発表標題 Proton pumping mechanism of cytochrome c oxidase by time-resolved vibrational spectroscopy
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会(招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	廣田 俊 (Hirota Shun) (90283457)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授 (14603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------