

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23657108

研究課題名（和文）走査型微小光共振器ラマンプローブ顕微鏡の開発と機械刺激に対する細胞応答の動態計測

研究課題名（英文）Development of Scanning Optical Resonance Cavity Raman Microscope and its Application to the Monitoring the Response of Cell under Mechanical Stimuli

研究代表者

由井 宏治 (YUI HIROHARU)

東京理科大学・理学部・准教授

研究者番号：20313017

研究成果の概要（和文）：

界面選択的に細胞の力学応答に伴う高感度ラマン分光計測の実現のために、微小光共振器を細胞に接触させ機械刺激を与える方法を検討した。プローブ方法の改良に、レーザー光の圧力を用いた方法に切り替えることで、独自の非接触的なプローブ顕微鏡の開発に成功した。さらに、同一の顕微鏡下で、細胞 1 個の共鳴ラマン信号と粘弾性特性の両方の検出に成功したことから、細胞 1 個の粘弾性特性の分子起源に迫れることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：

To obtain interface-selective Raman signals from a single living cell under mechanical stimuli, we have developed a scanning optical resonance cavity Raman microscope. To change the probe to one with a non-contact manner, we applied an optical pressure by laser-beam irradiation for probing the mechanical response of a single living cell at optional points utilizing a microscope. The newly developed original microscope enables us to measure the viscoelasticity of a single cell with a non-contact manner. In addition, resonant Raman signals were detected under the same microscope, which will provide information on the molecular origin of viscoelasticity in a single living cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：光共振器、ラマン散乱、顕微鏡、細胞、力学応答

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が外力による機械刺激に対して、どのように物理的・化学的に応答するかという基本的問題は、創傷の修復過程やがん細胞の細胞死誘導などにも関わり、古くから議論されているが未だに謎が多い学問領域である。

従来の細胞の構造力学モデルとして、米国の Ingber らによるテンセグリティーモデル

(N. Wang, *et al.*, *PNAS* 2001, 98, 7765)、シグナル伝達の生化学モデルとして日本の曾我部らによる張力活性化イオンチャネルモデルなどが提唱されている (K. Yoshimura, *et al.*, *PNAS* 2008, 105, 4033)。これら物理的・生化学的モデルにより、構造化学的反応に関与する蛋白質が明らかになりつつある。

その一方、細胞に与えた機械刺激が細胞中を物理的・化学的にどのように伝達し、細胞

がそれに対してどのように応答するかは未解明な点が多い。特にその初期の動態についてはほとんど手つかずの状態ともいえる。

このような背景のもと1個の生きた細胞における物理的・化学的応答を同時かつ高速で追跡できる計測ツールの開発が待ち望まれている。

研究代表者らは、これまで新規な高感度レーザーラマン分光計測法やリアルタイム非接触張力計測法を開発し、擬似生体膜における蜂毒酵素反応の追跡や、顕微分光法による細胞表面の非接触張力測定等に成功してきた。

このような背景を受け、我々がこれまで培ってきた分光技術をベースとした、走査型微小光共振器ラマンプローブ顕微鏡を開発し、1個の生きた細胞で、機械刺激に対する細胞の目的部位における粘弾性や化学反応の時間変化を追跡することを着想した。

## 2. 研究の目的

1個の生きた細胞上で、細胞膜表面の任意の点に時間的に制御された機械刺激を与え、そこで誘起される細胞骨格構造の変化に伴う粘弾性変化とそれに伴う細胞内シグナル伝達化学反応をマイクロ秒からミリ秒で時間分解追跡できる走査型微小光共振器ラマンプローブ顕微鏡を開発する。

機械刺激に対する細胞の形態変化や生化学的シグナル伝達反応に関しては、細胞骨格をなす蛋白質の構造変化、またはシグナル伝達の順序などについて、様々なモデルが提案されているが、骨格構造変化が誘起され、細胞全体に物理的信号が伝わる時間やシグナル伝達化学反応の各ステップにおける反応速度など、「時間」的な観点は世界的にみてもまだこれからの状況である。

本装置を開発することで、従来の電子顕微鏡や単結晶X線構造解析、特異的阻害剤の導入と生化学的解析では到達が難しかった、1個の生きた細胞における機械刺激入力後のマイクロ秒からミリ秒における物理的・化学的動態にはじめて光を当てることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞1個に機械刺激を与える方法の検討

① 走査型プローブ探針の先端に自作した真球微小光共振器を取り付け、その微小光共振器を細胞に直接押し込むことにより機械刺激を与える。

② ①のように細胞に接触させ機械刺激を与えるのではなく、光圧を用いて非接触に与える。

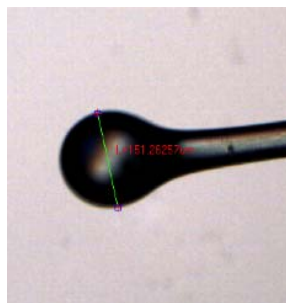


図1. 自作したガラス真球 (内径: 150  $\mu\text{m}$ )

(2) 細胞1個の機械刺激を受けた局所場のみからのラマンスペクトルを検出する。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞1個に機械刺激を与える方法の検討

#### ① 微小光共振器による細胞表面の押し込み

初め当初の計画通り、微小光共振器の作成を行った。微小光共振器の作成にあたって、微小光共振器によって機械刺激を受けた局所場からのラマンスペクトルを高感度で得るためには、微小光共振器への光の閉じ込め効果(多重全反射励起)による信号強度の飛躍的増強を起こす必要がある。そのために、十分な光共振を得られるほどの真球を再現性よく作成する必要がある。具体的には、ガラスキャピラリーを引き伸ばし、先端を熱して表面張力で自然に丸める方法で作成した(図1)。しかし、高い真球度を有する微小球を再現性よく連続的に作成するのは困難であり、真球作成に労力が多く費やされてしまうため、現状ではあまり実用的でないことが分かった。

ここで、微小光共振器を利用することの本質的な理由は、機械刺激を与えながらの表面選択的なラマン信号の検出である。さらにここで、微小光共振器を用いて押し込みにより機械刺激を与える方法は、細胞にプローブが接触してしまい、細胞への損傷が免れない。

そこで、当初計画していた微小光共振器を用いて直接細胞に機械刺激を与えるのではなく、以下②に記すような、光圧を用いて非接触に機械刺激を与え、応答計測が可能な非接触なプローブ顕微鏡の開発に着手した。同手法はレーザー誘起表面変位(LISD)機構を基盤としているので、以下、その方法をレーザー誘起表面変位(LISD)顕微鏡と記す。

#### ② 光圧による細胞表面の変形誘起

非接触に細胞に機械刺激を与える手法として、研究代表者は光子密度を上げ表界面に光圧による変位を生み出し、その緩和応答を計測する LISD 法を顕微鏡に組み込むことを着想した。

ここでは、本研究課題を実現するために、細胞計測のための空間分解能の向上や、変形を誘起するための光強度の変調周波数のダイナミックレンジの拡大を研究し、さらに具体的な試料として枯草菌細胞や酵母細胞の粘弾性特性を計測した。

i) 空間分解の向上と 100 Hz から 1 MHz の広変調周波数帯域での応答計測

我々が試験的に開発した LISD 顕微鏡の空間分解能は約  $10\ \mu\text{m}$  であったことから、大きさが  $1\ \mu\text{m}$  程度である核などの細胞内小器官や細胞の場所別の計測は困難であった。そこで、LISD 顕微鏡の平面方向の空間分解能を  $1\ \mu\text{m}$  程度にさらに向上する事を目的とし、最適な光学系や対物レンズの選定など装置の改良を行った。

まず平面方向の分解能を従来の  $10\ \mu\text{m}$  から  $1\ \mu\text{m}$  に向上させるために、レーザー光のスポット径をより高倍率の対物レンズを用いて絞った。さらに、照射位置決め精度を従来の  $2\sim 3\ \mu\text{m}$  から  $500\ \text{nm}$  に高めた。また、深さ方向に関しては、変位量検出のために用いるプローブ光の焦点深度が、約  $2\ \mu\text{m}$  である事を算出し、それを満たすよう深さ方向に数  $10\ \text{nm}$  のステップで移動可能な新しい移動機構を整えた。

さらに、試作機では、数 kHz から 1 MHz の周波数帯域での応答の計測に限られていたが、内部の粘弾性物性計測のためにはより低繰り返しによる機械刺激が望ましい。そこで、検出器等を工夫して、光強度の変調周波数のダイナミックレンジを低い方に 100 Hz まで拡張した。

空間分解能の高さを実証するため、計測対象には大きさが約  $1\ \mu\text{m}$  を有する代表的な細胞内小器官である枯草菌芽胞を用いた。芽胞の LISD パワースペクトルの計測結果を図 2 に示す。測定の結果、完全応答できる 3 kHz までのプラトー領域、3–100 kHz までの  $-0.4$  の傾きをもつ領域、100 kHz 以上の最終的に信号が熱揺らぎに埋もれて傾きが  $-2$  となる領域という典型的なパワースペクトルの計測に成功した。このことから、LISD 顕微鏡の空間分解能を  $1\ \mu\text{m}$  程度に向上させることを達成した。

ii) 細胞の骨格構造の差異の検出

大きさ  $1\ \mu\text{m}$  の枯草菌芽胞の粘弾性の検出に成功した事から、さらなる応用に挑戦した。繊維芽細胞のような通常の細胞は内部に繊維状の骨格構造を有する。一方枯草菌細胞は、

通常の細胞とは異なり、らせん状の骨格構造を形成するという面白い特徴をもつ。そこで、

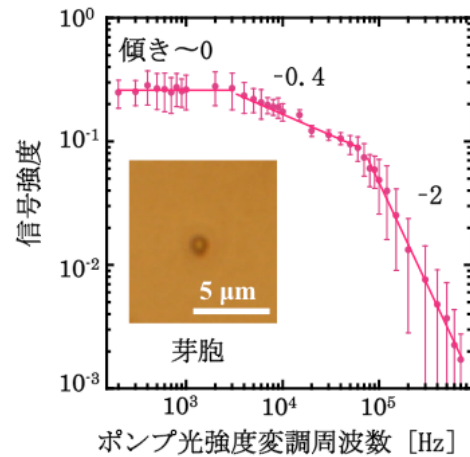


図2. 枯草菌芽胞のLISDパワースペクトル

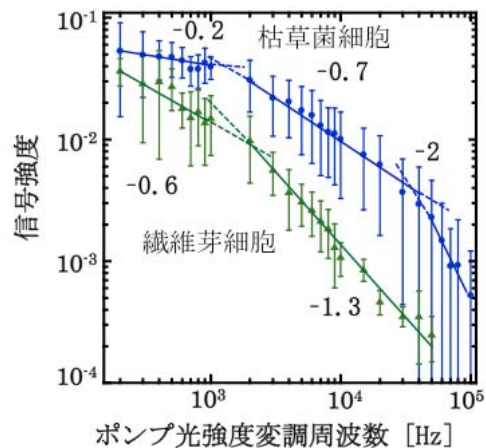
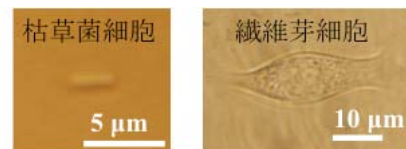


図3. 枯草菌細胞と繊維芽細胞のLISDパワースペクトル

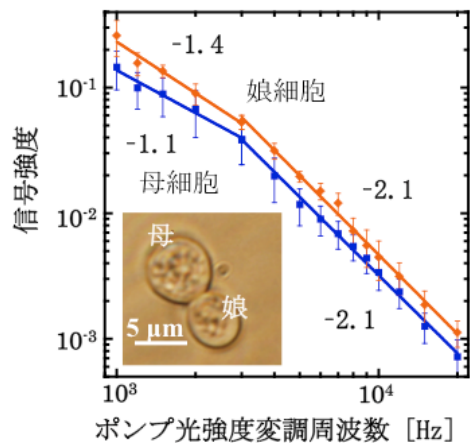


図4. 酵母細胞のLISDパワースペクトル

枯草菌細胞と繊維芽細胞の LISD パワースペクトルを比較し、内部骨格構造の違いに起因した粘弾性の差異の検出を行った (図 3)。スペクトルの傾きを比較すると、枯草菌細胞の方の傾きが小さいことから、らせん状骨格を持つ枯草菌内部の粘性は、繊維芽細胞より小さい事が明らかとなった。このことから、枯草菌細胞は、繊維芽細胞より固体的であることが示され、細胞内骨格構造のわずかな違いに起因した粘弾性の差異の検出に成功した。

### iii) 出芽酵母細胞の粘弾性計測

出芽酵母細胞は、かたい細胞壁と流動性の細胞質から成る不均一な階層構造を有する。さらに、出芽酵母は母細胞から娘細胞が出芽する特徴的な細胞周期を示し、その細胞分裂の過程は加齢モデルとして広く研究されている。これまで遺伝的・生化学的な解析は多くなされてきたが、細胞分裂時の母細胞と娘細胞の粘弾性の差異は明らかでない。その粘弾性の評価は、母細胞から娘細胞が出芽する際の、膜の流動性や細胞質の骨格構造の発達度合いの変化の理解をもたらす。

図 4 に、母細胞から娘細胞の出芽が進行しているときの、それぞれの細胞の LISD パワースペクトルを示す。母、娘どちらの細胞においても、変調周波数が 3 kHz より高い領域では、傾きが約 -2 となり、光圧による変形による変位量が、自発的な熱揺らぎに変位量に埋もれた。そのため、3 kHz より低い周波数での応答信号の差異が、母細胞および娘細胞の粘弾性の差異を示している。母細胞では、1 kHz から 3 kHz までの応答は、傾き -1.4 を示した。一方、娘細胞の傾きは -1.1 だった。この結果から、娘細胞の方が、母細胞よりも傾きが大きいことが分かる。つまり、娘細胞は、母細胞よりも粘性が大きい。ここで、電子顕微鏡のデータから細胞壁の厚みに差異がないことから、その傾きの差異は、細胞質の骨格の絡み合いの程度に寄与していること考えられ、娘細胞の方が細胞質中の細胞骨格の絡み合いの程度が大きいことが示唆された。

以上より、LISD 顕微鏡の空間分解能の向上、広変調周波数帯域での応答計測の実現、さらに繊維芽細胞、枯草菌細胞・芽胞、出芽酵母細胞の粘弾性の非接触計測に成功し、LISD 顕微鏡を進展させた。これにより、当初の目的よりもより進化させた非接触的な力学刺激・応答計測顕微鏡が実現した。

### (2) 細胞 1 個のラマン分光計測

本研究当初、微小光共振器内に光を閉じ込め、その光の閉じ込め効果 (多重全反射励起) による信号強度の増強を行う計画であった。ここで、細胞への機械刺激を与える方法を上

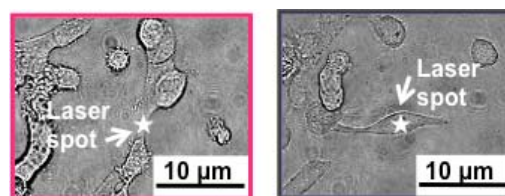


図 5. 計測個所を示す HeLa 細胞の光顕像 (左: 突起部、右: 中央部)

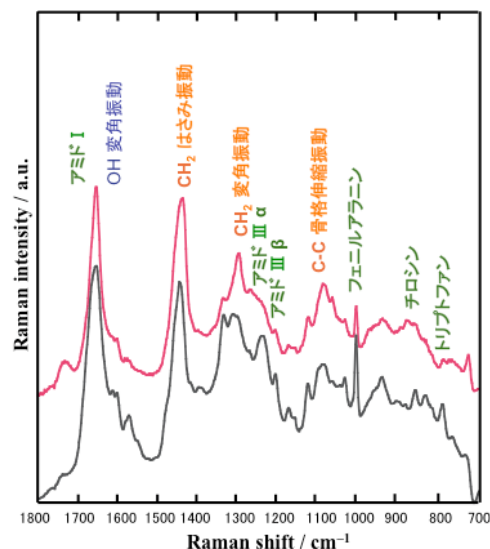


図 6. 細胞突起部 (赤) と中央部 (黒) のラマンスペクトル

記レーザー光の圧力を用いた非接触法に変更したことから、信号強度の増強方法に関しては、別の工夫が必要になる。非接触の良さを生かしたままでラマン信号増強を得るには、光の波長を変えて、共鳴ラマン過程と組み合わせると良い。そこで、ラマン散乱を高感度を得るため電子共鳴的方法を利用することを着想し、試験的に同一の顕微鏡下で細胞 1 個の共鳴ラマンスペクトルの計測を行った。

ここではモデル細胞として HeLa 細胞を用い、生きた HeLa 細胞 1 個の共鳴ラマン分光計測を行った。励起レーザーとして、Ar<sup>+</sup>レーザー (波長: 514.5 nm、出力: 800 mW) を用い、共焦点光学系を導入し、焦点付近の共鳴ラマンスペクトルの取得を試みた。

その結果、細胞突起部分 (図 5、左) と中央骨格部分 (図 5、右) でのラマンスペクトルの差異の計測に成功した。蛋白質や脂質由来の主要なピークが現れる 700–1800 cm<sup>-1</sup> に着目し、過去の脂質や蛋白質を帰属した文献を参考にして帰属を行った。図 6 に示すように、脂質由来のピークとして、リン脂質のアルキル鎖の振動を反映する CH<sub>2</sub> はさみ振動 (1440 cm<sup>-1</sup>)、CH<sub>2</sub> 変角振動 (1300 cm<sup>-1</sup>)、C–C 伸縮振動 (1050–1130 cm<sup>-1</sup>) のピークを帰属した。また蛋白質由来のピークとして、

蛋白質のペプチド骨格を反映するアミド I ( $1660\text{ cm}^{-1}$ )、アミド III ( $1250\text{ cm}^{-1}$ )、側鎖を反映するフェニルアラニン ( $1007\text{ cm}^{-1}$ )、チロシン ( $858\text{ cm}^{-1}$ )、トリプトファン ( $791\text{ cm}^{-1}$ ) のピークを帰属した。

このスペクトル結果から、細胞突起部分と中央部分で以下のような顕著な差異が二つ見られた。一つ目は、主要構成成分の違いである。顕著に現れる脂質のバンドである  $1440\text{ cm}^{-1}$  の  $\text{CH}_2$  はさみ振動と、同様に顕著に現れる蛋白質のバンドである  $1007\text{ cm}^{-1}$  のフェニルアラニンのバンドの強度比を比較した。その結果、フェニルアラニンのバンドの強度に対する  $\text{CH}_2$  はさみ振動の強度比は、突起部で約 7、中央部で約 1 と見積もられた。これは、突起部は中心部に比べて脂質の強度比が高いことが明らかになった。このことから、突起部は中心部に比べて、脂質リッチであるといえる。

二つ目は、脂質膜の流動性の違いである。脂質膜の流動性(秩序性)を反映するバンドである C-C 骨格の伸縮振動モードに着目した。C-C 骨格は、脂質のアルキル鎖を鋭敏に反映しており、トランス鎖は秩序構造、ゴーシュ鎖は無秩序構造を示している。秩序構造を示す  $1127\text{ cm}^{-1}$  のトランス鎖のバンドの強度に対する、無秩序構造を示す  $1083\text{ cm}^{-1}$  のゴーシュ鎖のバンドの強度比を比較した。その強度比は、突起部で約 2、中央部で約 1 と見積もられた。このことから、突起部は中心部よりも脂質膜の流動性が高いことが明らかになった。

これらの結果から、細胞突起部及び中心部における動的な構造特性を明らかにすることに成功したと言える。また、蛋白質の側鎖の分離計測にも成功し、ドーパミン代謝に関与するフェニルアラニン( $1007\text{ cm}^{-1}$ )や、チロシンリン酸化によるシグナル伝達に関与するチロシン( $858\text{ cm}^{-1}$ )、セロトニン代謝に関与するトリプトファン( $791\text{ cm}^{-1}$ )などの 3 つの蛋白質の側鎖を示すバンドに帰属することができた。このことから、蛋白質の側鎖の分離計測に成功したことは、蛋白質の代謝に伴う化学反応を生きた細胞中でその場計測できる可能性を示している。

ラマンスペクトルから得られた膜の流動性や組成比の顕著な差異と、LISD 顕微鏡によって得られた細胞の粘弾性特性の両方を同一の顕微鏡下で計測できたことで、細胞膜の流動性の分子起源や外的環境変化を鋭敏に捉え動的に運動する細胞の粘弾性特性の分子起源に迫れることが期待できる。

## 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]  
現在投稿準備中

[学会発表] (計 12 件)

①Toshinori Morisaku and Hiroharu Yui  
Noncontact Measurements on the Mechanical Properties of Biological Membranes in Single Living Cells by the Laser-Induced Surface Deformation Microscope  
International Union of Materials Research Societies-International Conference on Electronic Materials (IUMRS-ICEM 2012)  
2012 年 9 月 23-28 日、横浜

②城戸優梨子、森作俊紀、由井宏治  
レーザー誘起表面変位顕微鏡を用いた枯草菌生態サイクルの弾性的特性変化の追跡  
日本分析化学会第 61 年会  
2012 年 9 月 19-20 日、金沢

③城戸優梨子、蟻田彩子、森作俊紀、由井宏治  
レーザー誘起表面変位顕微鏡を用いた細胞内小器官の弾性的特性の非接触計測  
2012 年 5 月 19-20 日、鹿児島

④Hiroharu Yui and Toshinori Morisaku  
Development of the Laser-Induced Surface Deformation Microscope and its Application to Noncontact Measurements on Viscoelastic Property of Biological Membrane in a Living Cell  
International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference (IASIS 2012)  
2012 年 5 月 13-18 日、仙台

⑤Toshinori Morisaku and Hiroharu Yui  
Discrimination of the Differences in the Mechanical Properties of Biological Membranes between Different Types of Cells by the Laser-Induced Surface Deformation Microscope  
International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference (IASIS 2012)  
2012 年 5 月 13-18 日、仙台

⑥Toshinori Morisaku, Ayako Arita and Hiroharu Yui  
Non-Contact Measurement on the Mechanical Properties of Single Living Cell Membranes: (1) Development of the Laser-Induced Surface Deformation Microscope  
Pittcon 2012, 2012 年 3 月 11-15 日、Orlando (USA)

⑦Toshinori Morisaku, Ayako Arita and Hiroharu Yui  
Non-Contact Measurement on the Mechanical Properties of Single Living Cell Membranes: (2) Distinguishing the

Membrane Tension between Different Types of Cells by Laser-Induced Surface Deformation microscope  
Pittcon 2012、2012年3月11-15日、Orlando (USA)

⑧ Hiroharu Yui, Toshinori Morisaku, Ayako Arita, and Yusuke Igarashi  
Development of the Laser-Induced Surface Deformation Microscope for Non-Contact Measurements on the Mechanical Properties of Single Living Cell Membranes  
第21回日本MRS学術シンポジウム  
2011年12月19-21日、横浜

⑨ Toshinori Morisaku, Ayako Arita, Yusuke Igarashi, and Hiroharu Yui  
Distinguishing the Differences in the Mechanical Properties of Biological Membranes between Different Types of Cells by the Laser-Induced Surface Deformation Microscopes  
第21回日本MRS学術シンポジウム  
2011年12月19-21日、横浜

⑩ 森作俊紀、蟻田彩子、由井宏治  
レーザー誘起表面変位顕微鏡の開発と単一生細胞における生体膜力学物性の非接触計測への応用  
日本分析化学会第60年会  
2011年9月14-16日、名古屋

⑪ 蟻田彩子、五十嵐有輔、森作俊紀、由井宏治  
レーザー誘起界面変位顕微鏡の開発と単一生細胞膜張力の非接触測定  
第63回コロイドおよび界面化学討論会  
2011年9月7-9日、京都

⑫ Ayako Arita, Yusuke Igarashi, Toshinori Morisaku, and Hiroharu Yui  
Development of the Laser Induced Surface Deformation Microscope and its Application to Measure Surface Tension of Cell Membranes  
IUPAC International Congress on Analytical Science 2011 (ICAS2011)  
2011年5月22-26日、京都

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

① 森作俊紀、蟻田彩子、由井宏治  
(社)日本分析化学会第60年会 若手講演賞受賞「レーザー誘起界面変位顕微鏡の開発と単一生細胞における生体膜力学物性の非接触計測への応用」  
2011年9月14日

② 蟻田彩子、五十嵐有輔、森作俊紀、由井宏治  
(社)日本化学会 第63回コロイド及び界面化学討論会 ポスター賞受賞「レーザー

誘起界面変位顕微鏡の開発と単一生細胞膜張力の非接触測定」  
2011年9月8日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

由井 宏治 (YUI HIROHARU)  
東京理科大学理学部・教授  
研究者番号：20313017

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

大塚英典 (OTSUKA HIDENORI)  
東京理科大学理学部・准教授  
研究者番号：00344193