

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24350003

研究課題名(和文) 超解像赤外分光イメージングによるナノ空間機能解析

研究課題名(英文) Nano-space functional analysis of biological molecules by IR super-resolution microscopy

研究代表者

酒井 誠 (SAKAI, MAKOTO)

東京工業大学・資源化学研究所・准教授

研究者番号：60298172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、2波長レーザー分光法を利用した新規な赤外超解像顕微鏡を開発し、生体分子計測に適用した。装置の空間分解能はおよそ800 nmまで達し、ナノ空間における赤外情報を抽出する事を実現した。この装置を用いた超解像赤外イメージングにより、赤外マッピングが超解像で得られるだけでなく、分子配向やキラルの情報もイメージングする事が可能な、まさに新規な「ナノ空間機能解析」法の確立に成功した。今後、本手法が様々な分野で利用される事を期待する。

研究成果の概要(英文)：IR microscope is a powerful tool to measure molecular images of biological samples based on molecular information. However, microscopic objects such as biological cells cannot be measured by conventional IR microscope, because of its low spatial resolution about 10 μm . To overcome this problem, we have developed a novel type of IR super-resolution microscope based on vibrational sum-frequency generation detection. The application of this IR microscope to the biological samples was also carried out in this project.

研究分野：物理化学

キーワード：超解像 赤外分光 イメージング ナノ空間 振動和周波

1. 研究開始当初の背景

赤外顕微鏡で細胞内部を観察するといえは聞こえも良く簡単にできそうであるが、従来の赤外顕微鏡で実現することは困難であった。これは、赤外波長(2.5~25 μm)とレンズの開口数によって一意に決まる回折限界のため、赤外顕微鏡ではマイクロメートル以下の高い空間分解能で試料を観察することが物理的に不可能であることに起因する。例えば生体試料の場合、組織レベルでの観察は可能であるが、細胞内部の観察はできないことを意味する。しかし、もし、特定の赤外吸収の空間分布を細胞のサイズ以下(サブマイクロメートル)の空間分解能でマッピングし、その時間的な変化を追跡することが可能になれば、細胞内部の不均一な環境で起きる反応ダイナミクスを分子レベルで可視化できるはずである。これらの実現は、細胞観察を生業とする化学/物理/生物学者の悲願であった。

このような背景のなか、我々は2波長レーザー分光法を顕微鏡技術と融合することで、光の回折限界を突破した極めて高い空間分解能、すなわち超解像を有する赤外顕微鏡の開発に取り組んだ。開発の根幹をなす赤外超解像は、1)赤外可視2波長レーザー分光法を適用し、赤外情報を可視発光に変換する、2)発生する可視発光のみを集光・結像することによって原理上は達成可能と考えた。1つは過渡蛍光検出赤外分光法であり、もう1つは振動和周波発生(VSFG)法である。前者は、赤外光で分子を振動励起した後に、可視光(エネルギーは S_1-S_0 遷移よりも小さい)で振動励起分子のみを選択的に電子励起する。これにより生成した S_1 状態からの蛍光(過渡蛍光)を観察することで赤外情報を得ることができる。この手法は蛍光性の試料を高感度に検出することが可能である。一方、非蛍光性の試料には、後者を適用する。細胞の膜表面など非対称な環境にある分子やキラルな対称性を持った分子に赤外光と可視光を同時に入射すると、実際には存在しないエネルギー準位(仮想準位)に遷移した後、2つの振動数の和に相当するVSFG光が発生する。このVSFG光の強度は赤外光の波長が分子の振動に一致したときに著しく増大する。従って、試料からのVSFG光を観察することで赤外情報を得ることができる。上述の2法は、いずれも、赤外情報を可視波長領域の発光として観測するため、空間分解能は赤外光の回折限界より遙かに小さな可視光の回折限界まで容易に向上することができ、赤外超解像が達成される。これにより、細胞内部の赤外顕微鏡観察が実現可能となる。

2. 研究の目的

本研究課題の最終目標は「超解像赤外分光イメージングによるナノ空間機能解析」であ

る。2波長レーザー分光法を顕微鏡に利用することで光の回折限界を凌駕する極めて高い空間分解能、すなわち超解像を実現することが可能である。本研究課題では、この超解像レーザー顕微鏡法を赤外波長領域まで拡張した超解像赤外分光イメージング技術を生体試料切片から生細胞に至るまで幅広く適用し、極微小空間における局所構造・機能を分子レベルで観察・解析することが可能な「ナノ空間機能解析」法の確立を目指した。

3. 研究の方法

研究の方法・計画は以下の通りである。

- 1)ピコ秒波長可変赤外可視レーザーシステムの準備(事前準備)
- 2)中赤外波長領域観察用の超解像赤外分光イメージングシステムの設計・構築
第1ステップとして中赤外波長領域観察用の光学系を設計・構築し、超解像赤外分光イメージングによって観察できる領域をより長波長である7-8 μm のアミドバンドの領域まで拡張する。光学系は、非走査型から設計する。設計において、特に注意すべき点は、光学部品の材質である。赤外波長が3 μm 領域なら市販のガラス・石英製の光学部品でも赤外光が十分透過するのでそのまま利用可能であったが、6-9 μm の中赤外波長領域では、赤外光がガラスや石英を全く透過しないため利用できない。よって、集光レンズ、サンプル基板ともに中赤外波長が透過する特殊な光学材料(CaF_2 , BaF_2 等)で設計を行う。
- 3)超解像赤外分光イメージングによる標準試料計測
- 4)高感度・高S/N化と超解像赤外分光イメージングによる生細胞観察
標準試料として毛髪サンプルを用い、システムの性能評価を行い、空間分解能、検出感度等の評価基準を決定する。また、この装置を用いて、がん細胞の発現機構、赤血球の異常発現などの赤外超解像イメージングを行い、機能解析を推進する。

4. 研究成果

本研究課題推進の第1ステップとして、中赤外波長領域観察用の光学系を設計・構築し、超解像赤外分光イメージングによって観察できる赤外波長領域を、より長波長である8 μm 帯のアミドバンドの領域まで拡張することに成功した。試料観察のための光学系は、非走査型を採用した。非走査型光学系では、赤外光および可視光を試料全体に集光するため、可視発光の観察に用いる対物レンズの視野領域全体を非走査で一度に画像化することが可能であり、走査型の測定に比べて遙かに短時間で分子イメージングを実現することができる。これは、光に対して敏感な生体試料観察には極めて有効であると考えられる。本研究課題において設計・構築した

光学系では、日本人黒髪の毛髪横断面（試料の厚さ：3 μm ）のアミドバンドの赤外超解像イメージをわずか30秒で測定することが可能であり、光による試料損傷は全く観測されなかった。

次に、新規に設計・構築した光学系で、中赤外波長領域において超解像赤外分光イメージングが実現されているか否かを評価した。ここでいう、超解像赤外分光イメージングとは、1) 特定の赤外波長（振動数）で試料を超解像で赤外イメージングする、かつ、2) 特定の超解像領域（空間）において赤外スペクトルを測定する、ことを同時に行うことである。

標準試料に毛髪を用いて新規設計・構築した光学系の評価を行った結果、空間分解能：800 nm、エネルギー分解能：20 cm^{-1} を達成しており、「ナノ空間機能解析」を行うに十分な性能を実現している事を示した。加えて、ICCD 検出器・フィルター類を最適化する事により、測定には1パルスあたり5マイクロジュール程度の極めて低エネルギーの赤外光及び可視光を100マイクロメートル径で試料上に照射するだけで信号検出を可能とし、装置の高感度・高S/N化を実現した。

新規設計・構築した赤外超解像顕微鏡（空間分解能：800 nm、エネルギー分解能：20 cm^{-1} ）を用いて、ナノ空間機能解析の一環として、毛髪の機能/特性の解析を中心に研究推進した。毛髪は、様々な人種/年齢/生活様式によってダメージ度が異なり、それにより強度や形状も大きく変化する。これらの違いが毛髪内部の局所構造変化から生じるのか否かを中赤外領域における超解像赤外分光イメージングにより精査した。例えば、カールの度合いの異なる毛髪に対してアミドバンドにおいて α -ケラチンの毛髪内部の分布の観測を行い、カールの度合いと α -ケラチンの分布との相関を精査した。結果は、 α -ケラチンは直毛においてはコルテックス全体で均一な分布である一方、カールの度合いが大きくなるにつれてカールの内側に偏って分布していることが明らかとなった。この結果は、 α -ケラチンの毛髪内部の分布といったミクロスコピックな構造がカールの度合いといったマクロスコピックな形状を決めていることを示唆しており極めて重要である。加えて、本研究推進の過程で、毛髪 α -ケラチンの分子配向イメージングにも成功し、本顕微鏡法は分子配向を含めた分子情報を抽出可能であることも併せて示した。

加えて、振動和周波検出赤外超解像顕微鏡法による毛髪 α -ケラチンの分子配向イメージングに精力的に取り組み、 α -ケラチン由来のVSFG信号強度が著しい偏光依存性を示す事を明らかにした。 α -ケラチンの最小ユニットであるコイルドコイル構造の対称性と本研究における実験上の光学配置を考慮して、振動和周波発生理論解析を行った結果、信号が強く観測される偏光の組み合わせは

すべてキラル分子に由来するものであり、アキラル分子に由来する信号はほとんど観測されていないことが明らかになった。この現象は、 α -ケラチンの最小ユニットであるコイルドコイル構造の配向関係で説明する事ができる。即ち、隣り合う2つのコイルドコイル構造が平行に配向している場合は、キラルおよびアキラル信号は理論上、共に強くなる。一方、アンチ平行配向をしている場合は、キラル信号は強くなるのに対し、アキラルは打ち消し合い信号が観測されない。実験結果は、後者と合致しており、これにより、毛髪 α -ケラチンは最小ユニットであるコイルドコイル構造がアンチ平行に配向していると結論した。

以上のように、本研究課題において、超解像赤外イメージングにより、赤外マッピングが超解像で得られるだけでなく、分子配向やキラルの情報もイメージングする事が可能な、まさに新規な「ナノ空間機能解析」法の確立に成功した。今後、本手法が様々な分野で利用される事を期待する。

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 8 件)

(1) Makoto Sakai, Keiichi Inoue, Masaaki Fujii (査読有)

IR super-resolution microspectroscopy and its application to single cells

Curr. Pharm. Biotechnol., **14**, 159-166 (2013)

DOI:10.2174/138920113805219430

(2) Makoto Sakai, Katsuya Kikuchi, Masaaki Fujii (査読有)

Quaternary and secondary structural imaging of a human hair by a VSFG-detected IR super-resolution microscope

Chem. Phys., **419**, 261-265 (2013)

DOI:10.1016/j.chemphys.2013.02.016

(3) 酒井誠, 藤井正明 (査読無)

STED, 蛍光ディップ手法における高解像度実現の共通原理

O plus E, **36**, 147-151 (2014)

DOI:なし (URL:なし)

(4) Mitsuhiro Miyazaki, Akihiro Takeda, Matthias Schmies, Makoto Sakai, Kentaro Misawa, Shun-ichi Ishiuchi, François Michels, Klaus Müller-Dethlefs, Otto Dopfer, Masaaki Fujii (査読有)

Ionization-induced $\pi \rightarrow \text{H}$ site-switching in phenol- CH_4 complexes studied by IR dip spectroscopy,

Phys. Chem. Chem. Phys., **16**, 110-116 (2014)

DOI: 10.1039/C4CP00401A

(5) Matthias Wohlgemuth, Mitsuhiro Miyazaki, Martin Weiler, Makoto Sakai, Otto Dopfer, Masaaki Fujii and Roland Mitric (査読有)

Single water solvation dynamics probed by infrared spectra – Theory meets experiment, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 14601-14604 (2014)
DOI: 10.1002/anie.201409047

(6) 酒井誠 (査読無)

赤外顕微鏡によるがん細胞の生体反応計測技術

光学, **38**, 344-349 (2015)

DOI:なし (URL:なし)

(7) Mitsuhiro Miyazaki, Shunpei Yoshikawa, François Michels, Kentaro Misawa, Shun-ichi Ishiuchi, Makoto Sakai, Otto Dopfer, Klaus Müller-Dethlefs, Masaaki Fujii (査読有)

Mass analyzed threshold ionization detected infrared spectroscopy: Isomerization activity of the phenol-Ar cluster near the ionization threshold,

Phys. Chem. Chem. Phys., **17**, 2494-2503 (2015)

DOI:10.1039/C4CP04584J

(8) 酒井誠, 藤井正明 (査読無)

赤外超解像顕微鏡法

高分子, **64**, 588-589 (2015)

DOI:なし (URL:なし)

〔学会発表〕(計 15 件)

(1) 酒井誠、藤井正明 (招待講演)

振動和周波発生法を利用した赤外超解像顕微鏡の開発と生細胞への応用

日本膜学会第 34 年会境界領域膜シンポジウム「人工膜と生体膜をつなぐソフト界面」(早稲田大学, 東京) 2012 年 5 月

(2) 酒井誠 (招待講演)

2 波長レーザー分光法を利用した超解像赤外分光イメージングシステムの開発

応用物理学会第 49 回光波センシング技術研究会 (東京理科大学, 東京) 2012 年 6 月

(3) Makoto Sakai (招待講演)

Development of a mid-IR super-resolution microscope and its application to biological samples,

The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Symposium on “Star of life shined by frontier microscopies” (Nagoya, Japan) 2012 年 9 月

(4) Makoto Sakai (招待講演)

Observation of biological samples using an infrared super-resolution microscope,

The 17th East Asian Workshop on Chemical Dynamics (Fukuoka, Japan) 2013 年 1 月

(5) 酒井誠 (招待講演)

赤外超解像顕微鏡による生体試料観察
東京工業大学キャンパス交流フォーラム・プラスワン (東京工業大学, 横浜) 2013 年 3 月

(6) Makoto Sakai (招待講演)

Observation of human hair samples by a VSFG detected IR super-resolution microscope”,

The 7th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (Kobe, Japan) 2013 年 8 月

(7) 酒井誠 (招待講演)

赤外超解像顕微鏡を使って生体試料を観察する～原理から実測まで～

平成 25 年度日本分光学会生細胞分光部会シンポジウム (愛媛大学, 松山) 2014 年 3 月

(8) 酒井誠 (招待講演)

赤外超解像顕微鏡で生体試料を観察する
分光イノベーション研究会第 3 回シンポジウム (理化学研究所, 和光) 2014 年 5 月

(9) 酒井誠 (招待講演)

赤外超解像顕微鏡を使って生体試料を観察する

第 48 回量子物理化学セミナー兼理数 GP セミナー (Department lecture) (横浜市立大学, 横浜) 2014 年 7 月

(10) 酒井誠 (招待講演)

VSFG 検出赤外超解像顕微鏡法による毛髪 α -ケラチンの分子配向イメージング

第 6 回 SFG 研究会シンポジウム (筑波大学, 筑波) 2014 年 8 月

(11) 酒井誠 (招待講演)

赤外超解像イメージング法による生体分子のナノ空間機能解析

ナノマクロ物質・デバイス・システム創製アライアンス G3 分科会 (九州大学西新プラザ, 福岡) 2014 年 11 月

(12) Makoto Sakai (招待講演)

Super-resolving IR imaging of biological samples by using vibrational sum-frequency generation detection,

Department lecture of Brookhaven National Laboratory (New York, USA) 2015 年 1 月

(13) Makoto Sakai (招待講演)

Observation of molecular orientation of human hair α -keratins by a VSFG detected IR super-resolution microspectroscopy,

Kick-off symposium on International Collaboration in Chemistry Project on excited state dynamics of molecules in close proximity to nanostructured metal surfaces (New Jersey, USA)

2015 年 1 月

(14) Makoto Sakai (招待講演)

Observation of molecular orientation of human hair α -keratin fibers by a VSFG detected IR super-resolution microscopy,

2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Society (Pacifichem2015) (Honolulu Hawaii, USA) 2015 年 12 月

(15) Makoto Sakai, Kohei Ushio, Yukihisa

Watase, Masaaki Fujii (招待講演)

Vibrational sum-frequency generation detected IR super-resolution micro-spectroscopy of human hair α -keratins

The 3rd Tokyo Tech-Rutgers ICC Workshop in NAIST (奈良先端科学技術大学院大学, 生駒)

2016 年 1 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）
取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.csd.res.titech.ac.jp/indexj.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

酒井 誠（SAKAI, Makoto）

東京工業大学・資源化学研究所・准教授

研究者番号：60298172

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し