

細胞の無標識分子イメージング

Label-free Molecular Imaging of Living Cells

藤 田 克 昌

Katsumasa Fujita

^a大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻

要 旨 光を分子に照射した際に見られる光学現象である、ラマン散乱やコヒーレントアンチストークスラマン散乱 (CARS), ならびに高調波発生を用いれば、細胞や生体組織内の分子を標識せずとも顕微観察できる。ラマン散乱, CARS は分子の振動を検出しながら、その空間分布を観察像として与える。高調波発生は、コラーゲン、ミオシン等の生体内で配列構造をつくる非中心対象性分子のみを特異的に検出する。化学的、生物学的な標識技術は観察対象を改変する恐れがあるので、これらの光を用いた無標識イメージング技術は、生きた試料を観察する上で重要である。

キーワード : 分子イメージング, ラマン散乱, コヒーレントアンチストークスラマン散乱, 第2高調波, 細胞

1. はじめに 光学顕微鏡の利点

光学顕微鏡を用いる最大の利点は、生体を生きたまま観察できる点にある。エネルギーの小さなフォトンが分子との相互作用が小さいため、細胞や生体組織に損傷を与えることなく、それらの生命活動を捉えることができる。

光を用いるもう一つの利点は、試料からの蛍光や散乱光を分光すれば、物質の情報を得られることにある。このため、化学的な標識を用いずとも、生体内の分子を生きたまま観察し、その役割を把握することができる。例えばラマン散乱では、散乱光の波長が分子の振動数により決定されるため、試料内に存在する分子の構造や状態が分かる。また、非線形な散乱効果である高調波発生では、分子の配向状態やその配列構造をコントラスト高く可視化できる。

このような無標識での分子イメージングは、試料が生きた生体である際に最も威力を発揮する。蛍光染色等の標識技術は、化学的、遺伝的に生体試料を処理する必要があり、観察対象をありのまま観察できない場合がある。また、標識として導入した分子やタンパクが生体分子の活動に影響を与える恐れもある。

本稿では、光を用いて細胞中の生体分子を無標識でイメージングできる最近のレーザー顕微鏡について紹介する。ここで用いられる分子の分光分析技術は、材料科学の分野では当たり前のように用いられてきたが、試料の検出領域が小さい顕微観察では測定に長い時間がかかってしまい、十分な観察

速度で生きた試料を観察できなかった。しかし、近年、高感度な検出器と高出力で質の高いレーザーが登場し、現実的な速度で生体活動を分光分析しながら捉えることが可能となった。

2. ラマン散乱の利用

分子に散乱された光を分光すると、分子に照射した光と異なる波長が含まれている場合がある。これらの光には、分子振動にエネルギーを与えて分子を振動励起状態に励起波長が変化した光がある。このような光がラマン散乱光であり、その波長はエネルギーを奪った分子の振動数 (ν) の逆数 ($1/\nu$) だけもとの光の波長からシフトしている。分子の振動数は、分子の構造や周囲の環境により決定されるので、波長のシフト量を測定すれば、分子の種類や状態を調べることができる¹⁾。

図1は、波長532 nmの光を生きたHeLa細胞(ヒトガン細胞)に照射して得られたラマン散乱光スペクトルである。

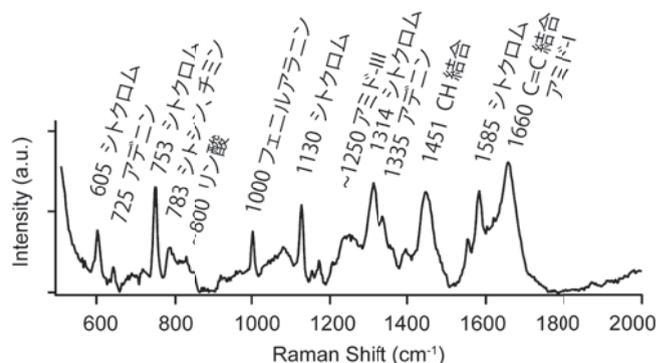


図1 生きたHeLa細胞の細胞質より得られたラマン散乱スペクトル。

^a 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1
TEL: 06-6879-7847; FAX: 06-6879-7330
E-mail: fujita@ap.eng.osaka-u.ac.jp
2008年9月2日受付

横軸はラマンシフトであり、光が分子に奪われたエネルギー (= 分子振動のエネルギー) に比例する量である。ラマンシフトは分子の振動により異なっており、このスペクトルからどのような分子振動に光がエネルギーを奪われたかがわかる。あるラマンシフトの光強度が大きいということは、そのラマンシフトを示す分子が多いということを示す。しかし、分子振動の種別によりラマン散乱の効率は異なるので、各ラマン散乱ピークの強度比はそのまま分子の濃度比とはならない。

図1に示すように、ラマン散乱の各ピークは試料中に存在する分子種を示している。例えば、 1450 cm^{-1} 付近のラマンピークは脂質分子のアルキル鎖に多く含まれる CH_2 の変角振動に帰属され、また、 1680 cm^{-1} 近辺のピークはタンパク質骨格構造をつくるペプチド結合の振動(アミド I モード)に帰属される。

ラマン散乱顕微鏡では、試料の観察領域の各点でラマン散乱スペクトルを測定し、得られるラマン散乱光強度の分布からラマン像を構築する。レーザー光を用いて試料を照明し、試料により散乱された光のスペクトルを分光器を通して得る。試料上での照明スポットの位置を走査しながらスペクトルを測定すれば、ラマン散乱スペクトルマップを得ることができる。ラマン散乱の散乱断面積は一般に 10^{-30} cm^2 程度と非常に小さい(蛍光測定との効率に比べ10桁以上低い)ため、従来のラマン散乱顕微鏡では測定に数時間程度の時間がかかっていた。しかし、最近、試料内の複数の点を同時に計測し数分でラマン像を得られる顕微鏡(図2)が開発され、生きた細胞の観察に適用できるようになった^{2,3)}。

図3に、生きた HeLa 細胞のラマン散乱像を示す。図に示したそれぞれの波数に現れるラマンピークの強度分布により、観察像を構成した²⁾。 753 cm^{-1} のラマンシフトはタンパク質の一種であるシトクロム c 内のヘムの振動モードに帰属できる。シトクロム c は照明光である 532 nm の光を吸収し、強い共鳴ラマン散乱を示すため⁴⁾、図3a)は細胞内のシトクロム c が主に観察されていると考えられる。シトクロム c はミトコンドリア内で ATP の生産に利用されるタンパク質

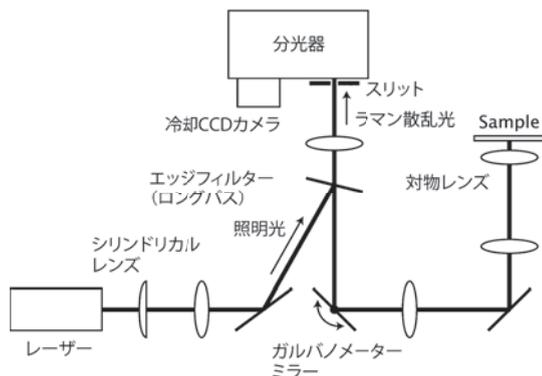


図2 スリット走査ラマン散乱顕微鏡の光学系。試料をライン状のレーザー光で照明し、広い範囲からラマン散乱スペクトルを同時に取得。

であり、図3a)の像はミトコンドリアの空間分布と酷似している。また、 1686 cm^{-1} は多くのタンパク質が共通にもつ β シート内のペプチド結合の振動モードに帰属できる。このため、図3b)は β シートを含むタンパク質が像のコントラストに寄与しており、それらは細胞に全体的に分布していると考えられる。図3c)は、 CH_2 の伸縮振動モードを示す 2852 cm^{-1} のラマン散乱の強度分布を示している。 CH_2 は脂質分子のアルキル鎖に多く含まれているため、図3c)は主に細胞や細胞内小器官の脂質膜、および脂質小胞の分布を示していると考えられる。このように、ラマン散乱を用いれば、標識無しでそれぞれの分子を観察できることが分かる。図3d)は、図3a), b), および c) を RGB のカラーチャンネルに適用して作成したカラー画像である。また、図4は、細胞分裂中の HeLa 細胞のラマン像を示している。一つの母細胞が二つの娘細胞に分裂する様子と、それに伴い生体分子の分布が変化する様子を観察できる。

このように非常に微弱なラマン散乱によっても生きた生体試料の観察が可能となったが、数分程度の撮像時間が必要であり、それよりも速い生体活動の観察はまだ不可能である。より速い変化を観察するには、より高感度に分子からの信号が得られるコヒーレントアンチストークスラマン散乱や高調波発生を利用する方法がある。

3. コヒーレントアンチストークスラマン散乱の利用

コヒーレントアンチストークスラマン散乱 (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering; CARS) は、非線形な過程を経て得られるラマン散乱で、試料に対し2つの振動数の異なる光が入射した際に観察される^{5,6)}。振動数の異なる2つの光が物質に入射すると、図5に示した四光波混合の過程により、振動数の大きな(波長の短い)散乱光が発生する。このとき、2つの光の振動数 (ω_p , ω_s) の差が、分子の振動数 Ω に一致すると、分子の振動励起準位に共鳴して光波混合が得られ、強い散乱光が得られる。この散乱光が CARS 光である。

CARS 光は入射する光よりも波長が短いため、蛍光性試料の観察も可能である。蛍光性の試料を通常のラマン散乱により測定すると、ラマン光よりも数桁強い蛍光のため、うまく分光測定を行うことができない。さらに、CARS 光の強度は通常のラマン散乱光の強度に比べて大きく、生体試料を高速、高解像に観察することに適している。

図6に CARS を利用したレーザー顕微鏡の光学系の例を示す。CARS は3次の非線形光学現象であり、その誘起には高い強度の光を必要とするため、CARS 顕微鏡の光源にはパルスレーザーが使用される。2台のパルスレーザー光源からの光を空間的、時間的に一致させ顕微鏡対物レンズに入射させると、対物レンズの焦点内の光強度を非常に高くでき、CARS 光を効率的に発生できる。発生した CARS 光は、試料の透過側に置かれた対物レンズにより集光され、光電子増倍管等により検出される。レーザー焦点を試料内で走査しながら、CARS 光の強度を測定すると、2つのレーザーの振動数

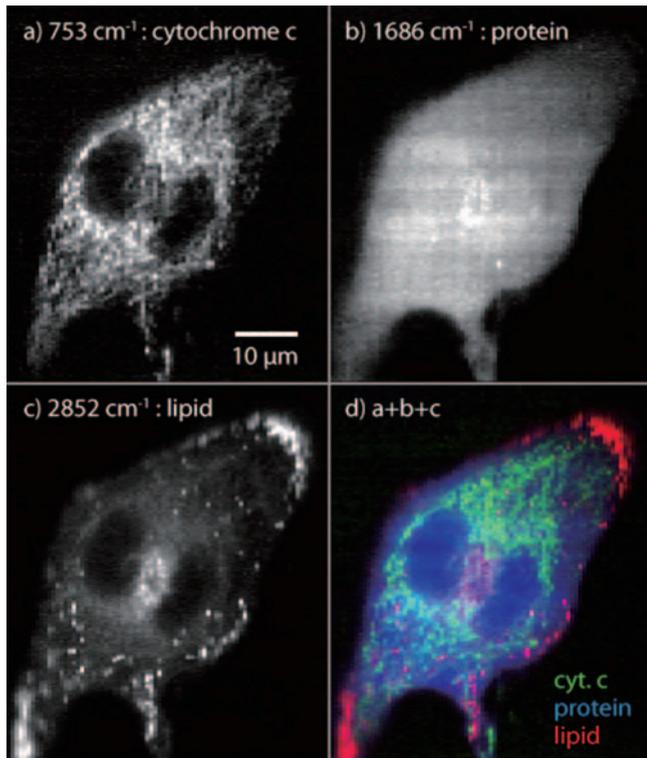


図3 ラマン散乱を用いて観察した生きた HeLa 細胞 (文献2より転載). a) 753 cm^{-1} (シトクロム), b) 1686 cm^{-1} (タンパク質), c) 2852 cm^{-1} (脂質) のラマン散乱の強度分布により観察像を構成. スケールバー = $10\text{ }\mu\text{m}$.

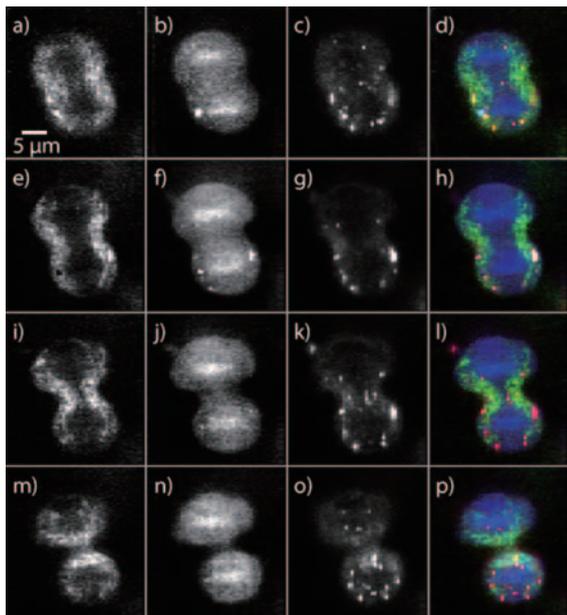


図4 ラマン散乱を用いて観察した細胞分裂中の HeLa 細胞 (文献2より転載).

の差に一致した振動数で振動する分子の分布を画像として観察できる. また, CARS 顕微鏡は非線形な光学現象を利用することから, 2光子蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡と同様, 3次

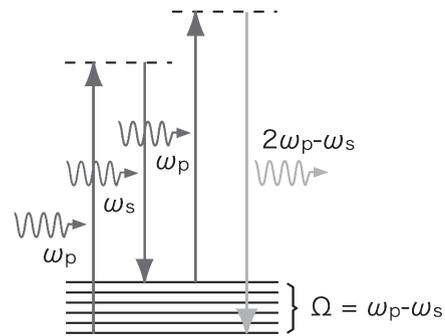


図5 コヒーレントアンチストークスラマン散乱

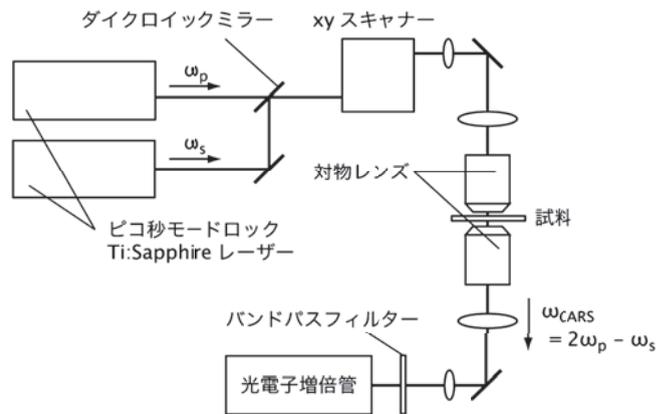


図6 コヒーレントアンチストークスラマン散乱顕微鏡の光学系の例

元方向に空間分解能を持ち, 試料の立体構造を観察することができる.

図7に, CARS 顕微鏡により観察した HeLa 細胞を示す. 細胞は特に処理はされておらず, 生きたまま観察されている. 図7a) および b) は, 2つのレーザー光の振動数を差をそれぞれ, 1446 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} のラマンシフトに一致させて得た, CARS 光の強度分布である. 1446 cm^{-1} のラマンシフトは CH_2 の変角振動に帰属され, 1240 cm^{-1} のラマンシフトはペプチド結合のアミドIII振動モードに帰属される. CH_2 は脂質分子に多く含まれ, またペプチド結合はタンパク質に多く見られるため, 図7a), および b) では, それぞれ, 脂質分子, タンパク質が画像コントラストに大きく影響していると考えられる.

CARS 顕微鏡は解像度の高い像を高速に得ることが可能であり, これまでビデオレートでの生体試料の観察例も報告されている⁷⁾. 一般的な CARS 分光測定では, 複数の分子振動を検出するには2つの光の片方の波長 (振動数) を掃引する必要がある, ラマン散乱スペクトルを得るには少々手間がかかってしまう. しかし最近では, 片方の光に波長帯域の広いパルスレーザーを利用し, 試料から得られる CARS 光を分光器で一度に分光測定するマルチプレックス CARS の顕微鏡応用も進んでいる⁸⁾.

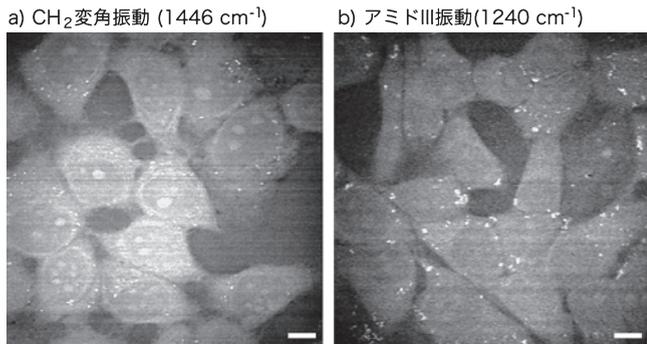


図7 コヒーレントアンチストークスラマン散乱による無染色のHeLa細胞の観察像. a) CH結合(変角振動), およびb) ペプチド結合(アミドIII振動モード)に対応するCARS光の強度分布を測定. スケールバー=10 μm.

4. 高調波発生の利用

第2高調波発生はレーザー光の波長変換に頻繁に利用される非線形効果である. 物質に光が入射した際に, 入射光のちょうど半分の波長の光が発生するのが第2高調波発生であり, そのためには, 非中心対称性の構造をもつ分子や結晶に光が入射する必要がある. 一見乱雑な構造を持っているように見える細胞や生体組織においても, 分子レベルではこのような条件を満たすものがある. 細胞の足場となって組織を支えているコラーゲンや, 筋繊維内のミオシン, 細胞内でのタンパク質の輸送に関わるチューブリン等のタンパク質が, それに該当する⁹⁻¹¹⁾. このため, 細胞や生体組織にレーザー光を照射して得られる第2高調波を測定すれば, これらのタンパク質の分布を標識無しでも観察できる.

第2高調波顕微鏡では試料内で発生する第2高調波の強度の分布により観察像を構成する¹²⁾. モードロックチタンサファイアレーザー等の近赤外超短パルスレーザーを試料内に集光し, そこから発する第2高調波の強度を測定しながら集光点を走査し, 画像を得る. 上記のように第2高調波発生の条件を満たす部位や物質があれば, その空間分布がコントラスト高く観察される. 第2高調波の強度は入射するレーザー光の強度の2乗に比例するため, レーザーの集光点内部のみから第2高調波が得られる. このため, 2光子顕微鏡や共焦点顕微鏡と同様, レーザー焦点を3次元的に走査すれば観察対象の立体的な分布も観察できる.

図8a)は, メダカの鱗皮に近赤外パルスレーザー光を照射して得た第2高調波像である. 鱗皮に多く含まれる繊維状のコラーゲンの存在を確認することができる. また, 図8b)は, ヒト心筋組織の第2高調波像である. 心筋細胞内の筋繊維の分布がコントラスト高く観察されており, その明るい部位は筋繊維を構成するミオシンの存在する部位に一致している. 図9は細胞分裂中のHeLa細胞を第2高調波により観察した例である. 細胞膜の部分は蛍光性タンパク質の発する蛍光であるが, 中心部のほうきのような部分から強い第2高調波が得られている. この部分には, 2つに分かれた染色体を

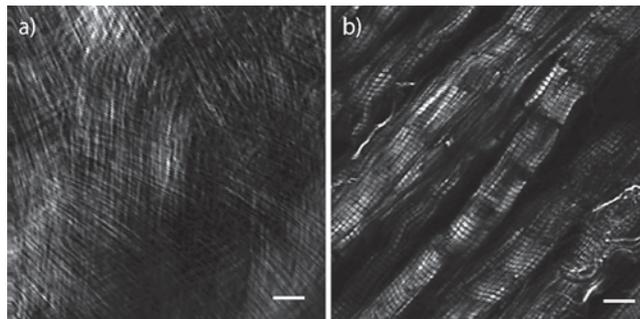


図8 a) メダカ鱗皮, およびb) ヒト心筋組織の第2高調波像. それぞれ, コラーゲン, ミオシンが主に象コントラストに寄与している. スケールバー=10 μm.

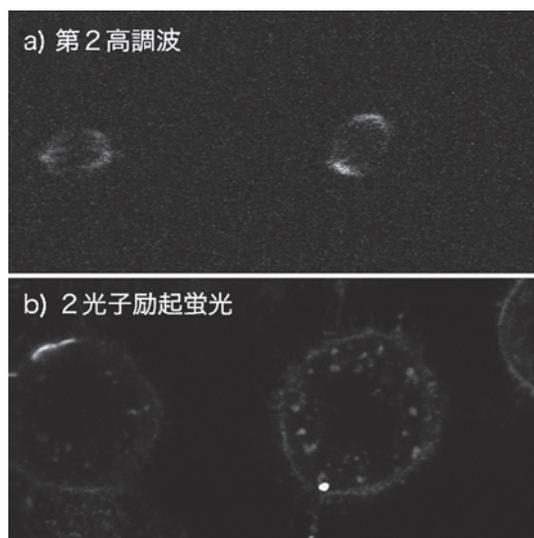


図9 HeLa細胞のa)第2高調波像, およびb)2光子励起蛍光像. 第2高調波では細胞内の微小管が, 蛍光では細胞膜の蛍光性タンパク質が観察されている. スケールバー=10 μm.

輸送する微小管が存在しており, 微小管を構成しているタンパク質(チューブリン)から第2高調波発生が得られているものと考えられている.

5. おわりに

本稿では, 生体分子を標識することなくイメージング可能な最近のレーザー顕微鏡について紹介した. 光学イメージング技術では, 物質の分析には化学的な作用の力を借りることが多かったが, 物質と光との相互作用を詳しく見ていくと, 物質をありのまま直接観察することも十分に可能である. 新しい光源や検出器が登場すると, 新しい光学現象が観察できたり, また現実的な時間で観察できなかった微弱な光学応答の観察が可能になる. 今後も光によって新しい世界が我々の目に映し出されることになるだろう.

文 献

- 1) 浜口宏夫, 平川暁子: ラマン分光法, 学会出版センター, 東京, 1988
- 2) Hamada, K., Fujita, K., Smith, N.I., Kobayashi, M., Inouye, Y. and Kawata, S.: *J. Biomed. Opt.*, **13**, 044027 (2008)
- 3) Hamada, K., Fujita, K., Kobayashi, M. and Kawata, S.: *Proc. SPIE*, **6443**, 64430Z (2007)
- 4) Spiro, T.G. and Strekas, T.C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2622 (1972)
- 5) Cheng, J.X. and Xie, X.S.: *J. Phys. Chem. B.*, **108**, 827 (2004)
- 6) 橋本 守: 分光研究, **49**, 51 (2000)
- 7) Evans, C.L., Potma, E.O., Puoris'haag, M., Cote, D., Lin, C.P. and Xie, X.S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 16807 (2005)
- 8) Wurpel, G.W.H., Schins, J.M. and Müller M.: *Opt. Lett.*, **27**, 1093 (2002)
- 9) Campagnola, P.J., Clark, H.A., Mohler, W.A., Lewis, A. and Loew, L.M.: *Nature Biotechnol.*, **21**, 1356 (2003)
- 10) Boulesteix, T., Beaurepaire, E., Sauviat, M. and Schanne-Klein, M.: *Opt. Lett.*, **29**, 2031 (2004)
- 11) Dombeck, D.A., Kasischke, K.A., Vishwasrao, H.D., Ingelsson, M., Hyman, B.T. and Webb, W.W.: *PNAS*, **100**, 7081 (2003)