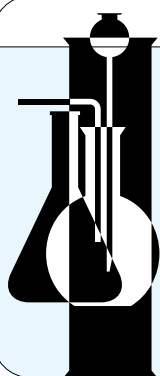


実験講座



クライオラマン散乱顕微鏡による細胞イメージング

藤田 克昌

Key words : ラマン散乱顕微鏡, クライオ顕微鏡, 分子イメージング, ラマンタグ, 無標識イメージング

ラマン散乱顕微鏡は細胞内分子を無染色で網羅的に観察できるが、蛍光法と比べて感度が低く、長時間の計測が必要であるという課題がある。本研究では、細胞を急速凍結し、低温に保持した状態でラマン散乱を観察するクライオラマン散乱顕微鏡技術を開発した。これにより細胞の動きや状態変化を抑え、信号量を蓄積できるため、高感度・高精度かつ試料への光損傷が少ない細胞分子イメージングを実現できる。

I. ラマン散乱による網羅的な分子イメージング

細胞にレーザー光を照射し、散乱されてくる光のスペクトルを詳細に観察すると、そのなかに、元の波長(色)と異なる光が現れる。この原因は幾つか考えられるが、そのうちの一つに、ラマン散乱光と呼ばれる光がある。この散乱光は細胞の分子の振動の影響を受けて、周波数(や波長)がシフトしている。分子の振動はその構造に依存するため、散乱光の周波数シフト量を計測することによって、細胞内の分子についての情報を知ることができる。近年、このラマン散乱を利用した分光分析技術の活用が、基礎生物学から医科学まで検討されている。その理由は、蛍光イメージングをはじめとするイメージング技術では得られなかった細胞内分子情報が得られると期待されているためである¹⁾。

図1はHeLa細胞の細胞質にレーザー光を照射した際に得られるラマン散乱スペクトルである。532 nmの単一波長の光を照射したにもかかわらず、様々な波長の光が生じていることがわかる。光の波長は光の周波数の逆数に比例するため、この波長の変化こそがラマン散乱によるものである(そのため、通常、ラマン散乱による波長の逆数のずれ=ラマンシフトがスペクトルの横軸に用いられる)。ラマン散乱光のピーク強度の空間分布を調べることによって、タンパク質や脂質、核酸の大まかな分布を無染色で調べることができ²⁾。また、シトクロームなどのヘムタンパク質は特定のレーザー波長において強いラマン散乱(共鳴ラマン散乱)が生じることが知られており、それらが関係する活動(アポトーシスや薬剤応答など)を高感度に観察することもできる³⁻⁵⁾。

ラマン散乱スペクトルの形は細胞内の分子組成を反映しており、細胞の種類や状態の影響を受ける。このため、ラマン散乱スペクトルを一種のフェノタイプとして捉えることもできる⁶⁾。このため、細胞の種類や活性状態など、細胞内分子の組成バランスや量で差異が生じるものをラマン散乱スペクトルで区別でき、細胞分化や病変をラマン散乱スペクトルとして捉えることも可能である⁷⁾。更に、最近では、1細胞レベルでのトランスクリプトームやがん細胞のプロファイリングがラマン散乱スペクトルと関連していることも多数

cryo-Raman microscopy for molecular imaging of cells

Fujita Katsumasa : 大阪大学大学院工学研究科物理学系専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1)

0370-9531/06/¥500/論文/JCOPY

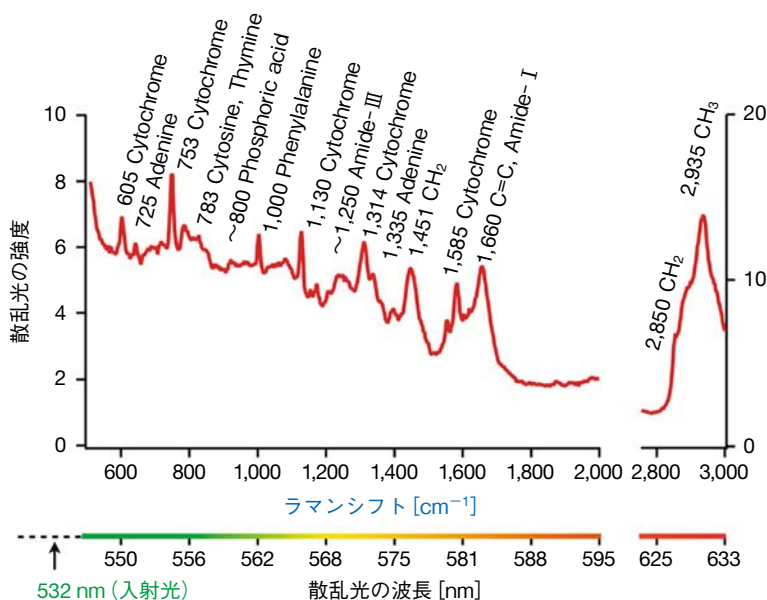


図 1 HeLa 細胞のラマン散乱スペクトル (細胞質)

報告されている⁸⁾。

一方、ラマン散乱用の標識技術も開発されており、従来の蛍光標識では可視化できない細胞内小分子や薬剤の観察や、多くの異なる分子種を標識して同時に観察する方法が提案されるなど、細胞内の複雑な分子相互作用や化学環境を総合的に理解するための計測ツールとしても期待されている。

このように、ラマン散乱の細胞分析への活用に向けて様々な研究が進められているが、ラマン散乱による分子検出感度は蛍光法に比べると 10 数桁ほど低い。このため、必要な信号対雑音比が得られない、また長時間の計測を必要とするため、動きのある対象を正確に計測できないという課題がある。そこで筆者らは、以下に紹介するように、細胞を凍結してラマン観察することにより、ラマン分光計測における信号対雑音比の向上や、細胞の動きや状態変化による計測精度の低下を抑えることを試みている。

Ⅱ. クライオラマン散乱顕微鏡

ラマン散乱光を用いた細胞観察の際の分子検出感度の向上、および細胞の形態・状態変化による計測精度の低下の抑制のため、細胞を急速に凍結

し、低温に保ったまま細胞をラマン散乱イメージングする技術の開発を進めている。凍結することによって細胞の動きを止め、その状態を長時間維持することが可能となることから、ラマン散乱光の分光計測の露光時間を長くし、ラマン散乱光の信号量を蓄積できるため、より高感度、高精度な計測が可能となる。また、凍結下では、光による試料の損傷を抑えることができるため、より豊富な分子情報の取得も期待できる。更に、細胞は凍結された瞬間の状態を保持しているため、ある特定の状態の細胞を時間をかけて分光分析することが可能となる。

図 2 に開発したクライオラマン散乱顕微鏡⁹⁾を示す。試料は温度調節が可能な冷却プレート (図 2: 金属板) と試料マウントの間に設置される。冷却プレートの温度は内部に供給する窒素ガスの流量と内部に埋め込まれたヒーターの制御により、周囲の環境変化によらず温度を安定化することができる。これにより、試料を低温に保ったまま長時間のラマン散乱観察が可能となる。

開発した手法では、試料の凍結も顕微鏡上で実施する。試料は常温の状態ではクライオスタット内に設置され、その後、液体寒剤 (プロパン, -185°C) を接触させることで急速に凍結する。液体寒剤は

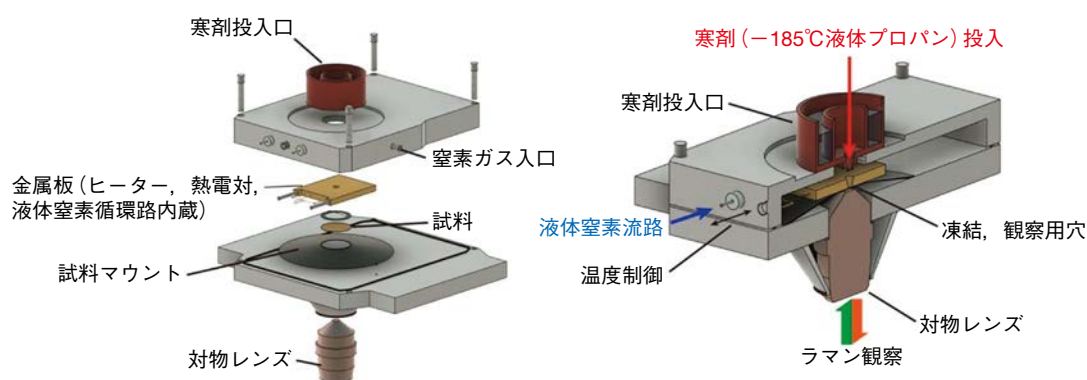


図 2 クライオラマン散乱顕微鏡の試料設置部の概略図

(文献 9 より改変して引用)

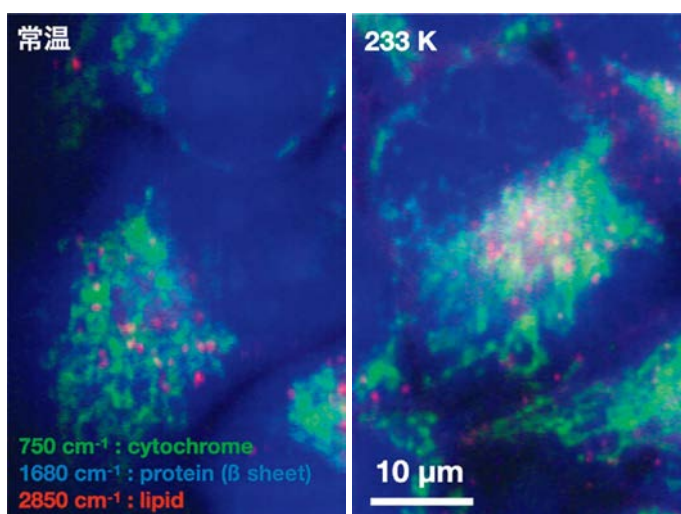


図 3 HeLa 細胞のラマン散乱像

(文献 9 より改変して引用)

冷却プレートに設けた穴より，上部から導入される。この方法により，他の場所で凍結した試料の移動や設置の際の温度変化による試料の劣化（融解など）を防ぐことが可能となる。また，試料をあらかじめ光学観察しておき，必要な観察部位や時間を決めて凍結し，クライオ光学観察することも可能となる。凍結後，冷却プレートによる温度制御を開始し，観察に適した温度が維持される。

図 3 に従来のラマン散乱顕微鏡 (20℃)，および開発したクライオラマン散乱顕微鏡 (−40℃) で観察した HeLa 細胞のラマン散乱像を示す。凍結試料の観察においても，ライブ観察を行った場合と

同様の観察結果が得られている。ゆっくりと細胞を凍結させた場合は，試料内に氷晶が形成され，細胞形態を大きく損なう原因となるが，本手法ではそのような大きな損傷は観察されていない。しかしながら，ラマン散乱スペクトルには氷晶の存在が確認されることから，おそらく光学観察できない程度の大きさの氷晶が多数形成されているものと思われる。その理由は，顕微鏡上での凍結の速度が十分でないこと，また，−185℃の液体寒剤で凍結したのち，−40℃程度まで温度を上昇させていること [強い背景光を生むプロパンの除去（蒸発）と低温で増強される自家蛍光の抑制が目

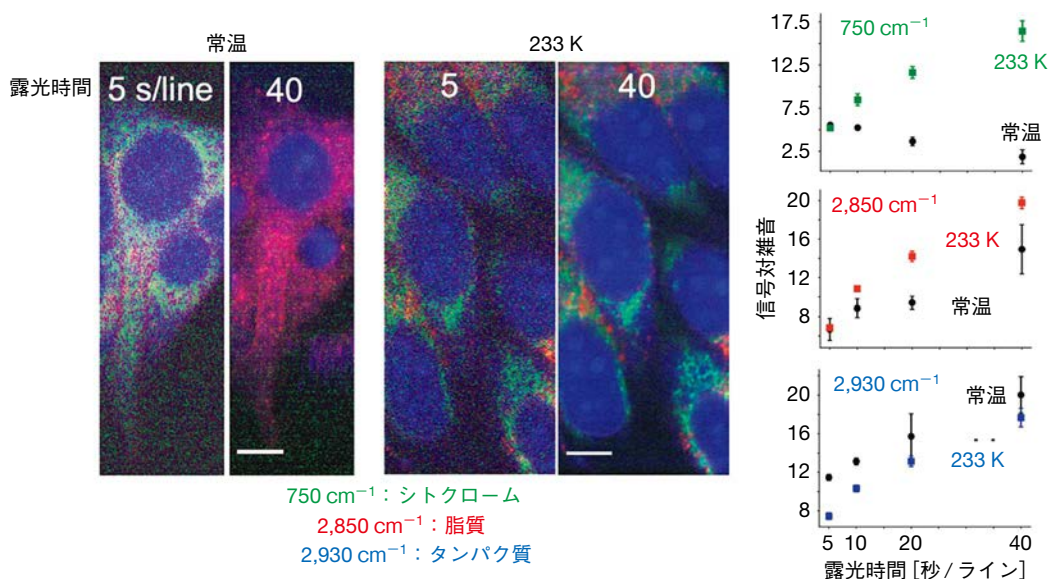


図 4 異なる露光時間と温度で計測した HeLa 細胞のラマン散乱像および信号対雑音比と露光時間との関係
ライン照明型のラマン散乱顕微鏡により観察

(文献 9 より改変して引用)

的] が考えられる。

図 4 は異なる露光時間で HeLa 細胞を常温、および低温観察したものである。低温観察では、露光時間を長くすることによって信号対雑音も期待どおりに増加しており、低温観察がラマン散乱観察の高感度化に有用であることがわかる。一方、常温観察では、シトクロームの信号が長時間露光でも増大していない。これは、シトクロームの光吸収を通じた損傷が原因であると考えられる。同様の現象は、カロテノイドからの信号にも確認されており、低温下での計測は光吸収を持つ分子の損傷を抑制し、高感度な分子観察を可能としていられる。このようにクライオラマン散乱観察では、計測時間に制限されることがほぼないため、光学系の有する空間分解能やスペクトル分解能を限界まで利用することを可能とする。常温における実際の計測では、ラマン散乱の信号量の制限から、物理的な限界まで空間分解能を向上することは難しいが、低温条件では、試料の安定性を活かして計測機器の性能を引き出すことができるようになる。

Ⅲ. 細胞のクライオラマンイメージング

凍結固定は、対象を物理的に固定するため、パラホルムアルデヒドなどを用いた化学固定では観察できなくなってしまう対象も固定し、観察を可能とする。化学固定は主にタンパク質の分布を固定するものであるため、サイズの小さな分子や分子の酸化還元状態を固定できないが、凍結固定はこれらをも固定し、観察可能とする。

図 5 に、アルキンタグを導入したユビキノンを HeLa 細胞に取り込ませてラマン散乱顕微鏡で観察した結果を示す。それぞれ還元型のシトクロームが強く示すラマン信号(緑色)とアルキンタグ(紫色)の細胞内の空間分布を示している。図 5 のそれぞれの観察結果を比較すると、凍結固定後の HeLa 細胞において、シトクロームおよびアルキンタグ(ユビキノンの)コントラストは大きく変化していないが、パラホルムアルデヒドで固定した細胞では、各画像のコントラストが大きく低下していることがわかる。これは、化学固定の際にシトクロームの酸化、およびユビキノンの細胞内からの消失により各像のコントラストが低下したものと推測される。これらの結果から、凍結固定で

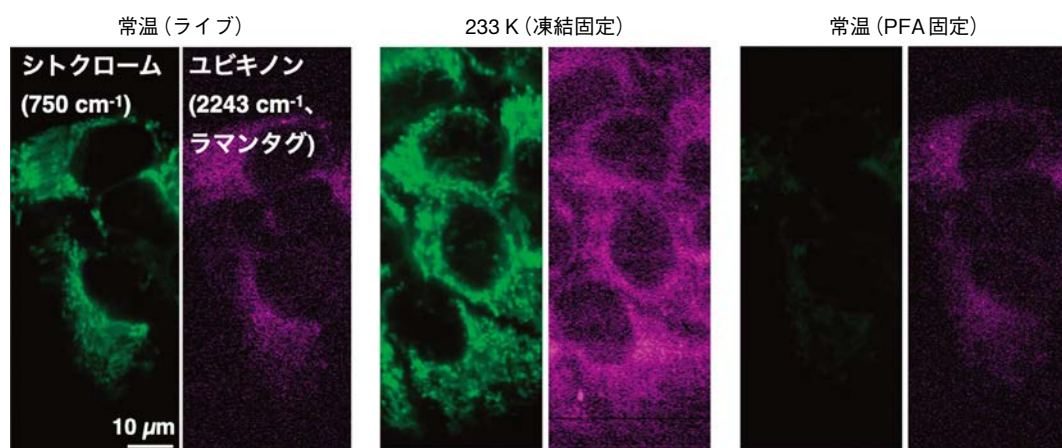


図 5 ユビキノ (ラマンタグで標識) を導入した HeLa 細胞のラマン散乱像

PFA：パラホルムアルデヒド固定液

(文献 9 より改変して引用)

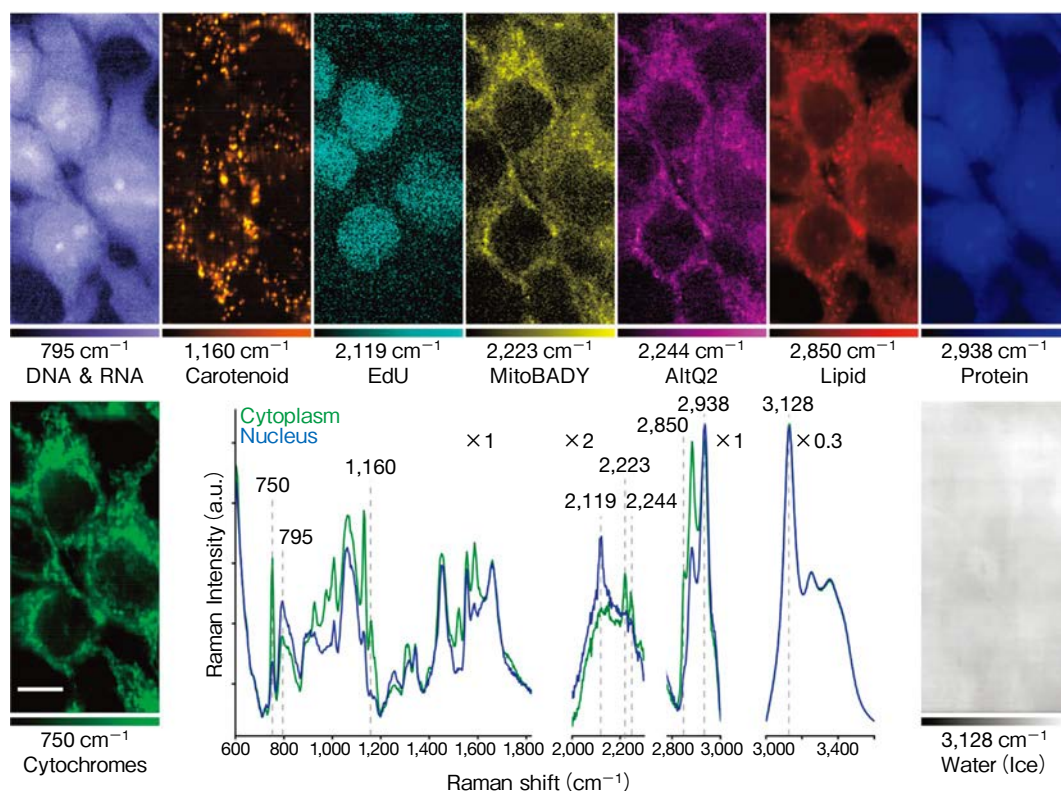


図 6 3 種類のラマンタグ標識を導入した HeLa 細胞の多重分子ラマンイメージング

EdU：デオキシウリジン，AltQ2：ユビキノ，MitoBADY：ミトコンドリア

は、化学固定に比べて、細胞内の状態をより自然に近い状態で保持できることが示唆されている。

凍結固定を行うことにより、時間をかけてラマン散乱観察を行うことができるため、多重情報の

観察というラマン散乱の利点をより有効に活用できる。図 6 は、3 種類のラマンタグによる標識した分子や細胞内構造、および内在性分子からのラマン散乱を同時に観察した結果である。ラマンタ

グにより、ユビキノン、EdU (デオキシウリジン)、ミトコンドリアが特異的に可視化されていることに加え、シトクローム、タンパク質、脂質、カロテノイド、水の分布がそれぞれの分子が生じるラマン散乱により示されている。

おわりに

本稿では、試料を顕微鏡上で急速凍結し、そのままラマン散乱顕微鏡で観察する技術について紹介した。ラマン散乱は微弱な光学効果であるため応用先が制限されてきたが、凍結固定はその制限を緩和できる。試料の固定は常温でも可能であるが、長時間の光照射において試料は形態や状態を変化させるため、より自然な状態で試料を観察するには、低温下での観察が極めて有効である。特に、ラマン散乱スペクトルは試料の化学的特性を反映するため、試料内の化学的な変化を凍結により大きく低下させることは、形態観察を目的とした手法に比べて、特に重要となる。低温下での観

察は、ラマン散乱顕微鏡だけでなく、他の光学顕微鏡の応用にも多くの利点をもたらす。これらの利点については今後明らかになり、利用されるようになるであろう。

●文 献

- 1) Dodo K, Fujita K, Sodeoka M : *J Am Chem Soc.* **144** : 19651-19667, 2022
- 2) Palonpon AF, Ando J, Yamakoshi H et al : *Nat Protoc.* **8** : 677, 2013
- 3) Okada M, Smith NI, Palonpon AF et al : *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109** : 28-32, 2012
- 4) Li J, Li M, Nawa Y et al : *Anal Chem.* **96** : 15765-15772, 2024
- 5) Li M, Nawa Y, Ishida S et al : *Commun Biol.* **5** : 778, 2022
- 6) Fujita K : *Nat Methods*. In press
- 7) Auner GW, Koya SK, Huang C et al : *Cancer Metastasis Rev.* **37** : 691-717, 2018
- 8) Kobayashi-Kirschvink KJ, Comiter CS, Gaddam S et al : *Nat Biotechnol.* **42** : 1726-1734, 2024
- 9) Mizushima K, Kumamoto Y, Tamura S et al : *Sci Adv.* **10** : eadn0110, 2024