

ビデオレート超解像赤外吸収顕微鏡の開発

大阪大学 大学院基礎工学研究科 助教 加藤 遼 *

1. はじめに

生体内で起きる様々な生命現象を理解するためには、それらを支配する細胞内の分子複合体の分布や構造、オルガネラの動態を高い時空間分解能で観察することが必要である。分子の化学構造を反映する光学効果(ラマン散乱・赤外吸収)を計測するラマン分光法や赤外分光法は、細胞内のタンパク質や核酸などの分布を蛍光標識なし(ラベルフリー)で可視化できる。また、化学結合情報を直接観察するため、生体内での分子の化学構造変化も分析できる。特に、サブマイクロ空間分解能を有するラマン分光法は、これまで細胞など多くの生体試料の機能解析に利用されており、生命科学の景色を刷新してきた。しかし、ラマン散乱光を取得するためには、高強度の入射光を要する。それゆえ、生物本来の機能やそれらが示す現象をありのままに観察することは難しい。その点、赤外吸収分光はラマン分光に比べ断面積が5桁以上も高いため、非破壊な分子イメージングが可能である。特に、タンパク質の2次構造や官能基の微小な変化が観察できるため、生体機能観察において高いポテンシャルを示す光計測技術である。しかし、赤外顕微鏡の空間分解能は10 μ m程度に制限される。細胞内の分子複合体やオルガネラを観察するためには、少なくともサブマイクロ程度の空間分解能が必要である。そこで、赤外顕微鏡の空間分解能を向上できれば、細胞内の分子ダイナミクスを真の状態を保ったまま高速観測できるという着想に至った。

その背景の元、筆者はサブマイクロ空間分解能と高い検出感度を併せ持つ超解像赤外顕微鏡の開発に取り組んできた[筆者筆頭,Vib. Spectro.,

(2022)]。この赤外顕微鏡は、分子の赤外吸収に伴う体積膨張を可視光を用いて検出することで、サブマイクロ空間分解能の赤外吸収イメージングを可能にする。筆者はこれまでに、組織切片のラベルフリー赤外分光分析に成功している[筆者筆頭,Anal. Chem.,(under revision)]。しかしながら、細胞内の分子動態を可視化できるほどの時間分解能は達成できておらず、技術的改良の余地がまだ残されている。本研究では、超解像赤外吸収顕微鏡のさらなる技術改良と生体観察の原理実証を通して、細胞内の分子動態をビデオレート・超解像・ラベルフリー計測できるバイオイメージング基盤の確立を目指す。細胞内に存在する低濃度の分子の状態を同定し、生命現象や疾病原因に新たな知見を与えることができる革新的な光計測技術と位置づけられる。

2. 研究方法と成果

2.1. 超解像赤外吸収顕微鏡の改良

Fig. 1(a)に、開発した手法の光学系を示す。これまでの装置では、可視光と赤外光を同軸で同じ反射型対物レンズを用いて集光していた。しかし、反射型対物レンズは開口数NAが1以下に限られるほか、低NA成分のスループットも低いため検出効率が低い。そこで、赤外光と可視光を別々の対物レンズで集光することで、可視の散乱光の検出効率を1桁以上向上することができる。また可視光は、顕微鏡下部から高NA(1.2)の透過型対物レンズで集光することで、高い検出効率と空間分解能(260 nm)が得られる。可視の散乱光強度をロックイン検出することで、赤外パルス光の周波数成分で変調される強度成分、つまり赤外吸収信号を抽出できる。

* (助成採択時) 徳島大学ポストLEDフォトリソ研究所 特任助教

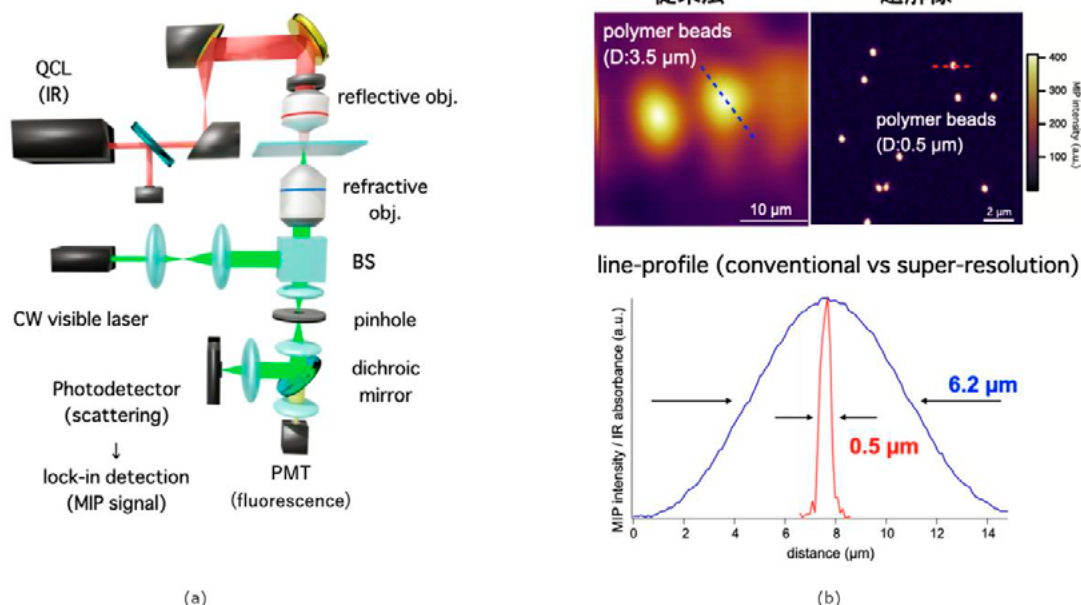


Fig. 1 (a) 超解像赤外分光顕微鏡の光学系. (b)従来法とのイメージング性能の比較

開発した手法を用いた測定結果を Fig. 1 (b)に示す。従来の赤外顕微鏡で撮像されたポリマー粒子（直径 $3.5\ \mu\text{m}$ ）の赤外吸収像と、我々が開発した手法で取得したポリマー粒子（直径 $0.5\ \mu\text{m}$ ）の赤外強度像の比較である。どちらもポリスチレンの芳香環伸縮振動由来の赤外吸収強度（波数 $1494\ \text{cm}^{-1}$ ）で画像化されたものである。中赤外光熱変換顕微鏡では、 $1\ \mu\text{m}$ 以下の直径を持つ対象物であっても可視化できることが示されている。また、強度のラインプロファイルからも空間分解能の向上が明らかであり、従来と比較して 10 倍以上も高い空間分解能が得られている。また、1 点あたりの露光時間は、5-10 ms であり、高速イメージングが可能である。加えて、測定できる波数領域を拡張するために、異なる 2 つの中赤外レーザーを合波する光学系も確立し、これまで検出できていたアミノ酸や DNA に加えて、タンパク質のアミド結合情報や脂質のカルボニル基の情報も取得できる計測基盤も整えた。高速化に関しては、申請当初はビデオレート（秒オーダーの撮像

時間）を目指していたが、走査機器の機械的な律速や感度の観点から、分オーダーの高速性に留めておくことにした。開発した手法を用いて、生物計測応用を行なった。

2.2. マルチモーダルイメージングによるバクテリアバイオフィルムの可視化

超解像赤外吸収顕微鏡は、高い空間分解能に加えて、バイオイメージングにおけるもう一つの重要な利点がある。それは、試料の蛍光が赤外吸収信号と相互干渉しないため、2 つを共立化できることである。試料からの散乱光を蛍光フィルターで分光することで、蛍光信号と可視光の応答から読み出した中赤外吸収信号を個別に検出することが可能である。この特徴により、蛍光標識された試料や強い自家蛍光を持つ試料に対して、蛍光および赤外分光イメージングを同時に行うことができる。実際の応用例として、光合成微生物である藍藻と藍藻が細胞外に生成する多糖を主成分とするバイオフィルムのイメージング分析を

行なった。

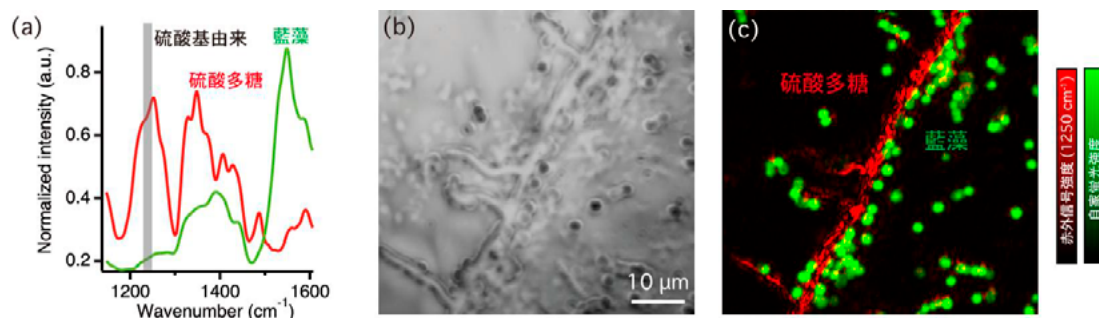


Fig. 2 (a) シアノバクテリアと硫酸多糖の中赤外スペクトル、シアノバクテリアバイオフィルムの(b)明視野像とマルチモーダルイメージング結果 (c). 緑：自家蛍光, 赤：中赤外光熱強度

自家蛍光を利用して藍藻を観察し、藍藻が生成する硫酸多糖の特定振動モードを用いてイメージングを行い、バイオフィルム内の各成分の分布を可視化した。[Fig. 2](#) (a)に、藍藻と硫酸多糖の赤外吸収スペクトルを示した。硫酸多糖に含まれる硫酸基は、主にタンパク質で構成されるバクテリアとは異なる独自の赤外吸収信号を示す。この特異な波数領域を用いることで、硫酸多糖の可視化が実現できる。[Fig. 2](#) (b),(c)には、透明基板上に生成された藍藻バイオフィルム試料の明視野画像、硫酸多糖の赤外吸収信号強度、およびバクテリアの自家蛍光強度が示されている。このマルチモーダルイメージングの結果、バイオフィルム内で藍藻と硫酸多糖が明確に可視化できた。この観察から、バイオフィルム内の硫酸多糖が繊維状の構造を形成し、その構造に沿って藍藻細胞が整列していることが判明した。しかし、他の領域をイメージングした結果では、藍藻細胞が必ずしも繊維状構造に沿って並んでいるわけではないことも確認された。従来の説では、バイオフィルムはブルーム状に形成されると考えられており、実際にマクロレベルでの観察でもブルーム状の形成が確認されていた。硫酸多糖の集合体が形成され

た後、培養液中で藍藻細胞がこれに結合し、気泡の浮力により自然に集まって密集したバイオフィルムが形成され则认为られてきた。今回のイメージング結果は、この予測が正しいことを示唆していると我々は考察している。今回は特に藍藻の硫酸多糖に焦点を当てて解析を行ったが、今後はバイオフィルムの形成や機能に関わるタンパク質や核酸など他の分子についても可視化を行う予定である。

2.3. 将来展望

超解像蛍光顕微鏡が様々な生物学的知見を与えたように、本技術により様々な生命現象のメカニズムや疾病原因を化学構造の観点から議論できることが本技術の特色である。例えば、生体機能の阻害や神経変性疾患の原因となる生体内のタンパク質のリン酸化や変性・凝集をリアルタイムで観察できるため、生体機能・疾病のメカニズム解明に貢献することが期待される。また、リン酸化による病気の進行度合いやウイルス感染者の重症度を示す血液中の ATP 濃度を非破壊で計測することなどにも応用可能なため、生命科学だけでなく、医学や創薬分野など広範な分野へ波及効果を持って貢献できると考える。計測対象とし

ても、細胞にとらわれずに広い意味での生体計測の可能性も本研究期間内で模索した。微生物や動物細胞以外に、歯科接着治療で用いる歯科用接着剤も強い自家蛍光を発する生体材料の1つであり、それらの分析においてもプレリミナリーな結果が現在出てきている。

またダイナミクス計測に向けては、更なる装置改良が必要となるという知見が得られた。今後の課題としては計測速度である。これはガルバノミラーによるレーザースキャンとデジタイザを利用した高速計測によって改善する予定である。計測の高速化も然りであるが、細胞培養を顕微鏡観察下で行う必要があると分かった。そこで、流体デバイス等を利用し、顕微鏡観察下で細胞培養できる環境を整えている (Fig. 3)。現状はこれらを統合した計測プラットフォームの確立まではできていないが、近い将来本イメージングと組み合わせることで、細胞内の分子動態を可視化することに挑戦できると期待している。



Fig. 3 顕微鏡観察下での細胞培養用のマイクロ流体デバイス

3. その他成果発表等

3.1. 論文発表

- ・ Ryo Kato*, Kaisei Maeda*, Taka-aki Yano, Kan

Tanaka, and Takuo Tanaka, “Label-Free Visualization of Photosynthetic Microbial Biofilms using Mid-Infrared Photothermal and Autofluorescence Imaging”, *Analyst*, **148**, 6241-6247 (2023)

3.2. 学会発表

- ・ Ryo Kato, “Paving Ways of Mid-Infrared Photothermal Microscopy for Biomedical Analysis”, The 22nd Annual Meeting of The Japan Association of Medical Spectroscopy, Osaka University, 2024.11.26
- ・ 加藤 遼, “微生物の代謝物解析に資する顕微分光計測法の開発と応用”, 日本微生物生態学会第37回広島大会 代謝物解析を通じて覗く環境微生物の世界, 広島国際会議場, 2024.10.31
- ・ Ryo Kato, “Mid-infrared chemical imaging using mid-infrared and visible lasers for biochemical analysis”, LDC2024, Tokyo, 2024.04.24
- ・ 加藤 遼, “中赤外光熱変換計測を用いたラベルフリー生体化学分析”, レーザー学会学術講演会第44回年次大会, 東京, (2024年1月17日)
- ・ Ryo Kato*, Taka-aki Yano, and Takuo Tanaka, “Mid-infrared photothermal spectroscopy and imaging for biochemical analysis”, Colloquium Spectroscopicum Internationale XLIII, June 27th. 2023, Tokushima Japan

4. 謝辞

本研究成果は、島津科学技術振興財団の助成金による支援を受けて実施しました。