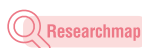




凍結細胞を無標識で分析イメージングする ラマン散乱顕微鏡

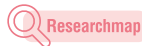
工学研究科 物理学系専攻

教授 藤田 克昌

<https://researchmap.jp/read0089911>

先導的学際研究機構

准教授 熊本 康昭

<https://researchmap.jp/jemappellekuma>

工学研究科 物理学系専攻

特任准教授 山中 真仁

https://researchmap.jp/masahito_yamanaka

研究の概要

本研究では、生体試料を急速凍結し、低温下で無標識・高感度にラマン観察を行う「クライオ・ラマン顕微鏡」を開発した。従来、生体分子由来のラマン散乱光は微弱で、レーザー光による試料損傷や観察中の変化により、信号対雑音比や分解能、観察視野が大きく制限されていた。本手法は、試料を -185°C 付近で急速凍結固定し、試料の構造・化学状態を保持したまま長時間安定観察を可能にする。これにより、高分解能・高S/N比・広視野で細胞や生体組織内の分子を詳細に分光分析することが可能となった。

研究の背景と結果

従来、ラマン顕微鏡は生体試料内分子の分布や化学状態を非侵襲的に可視化できる有望なツールとして注目されてきた。しかし、生体分子から得られるラマン散乱光は極めて微弱であり、その高感度検出には強いレーザー照射が必要となる。この過程で試料はしばしば光損傷を受け、構造や化学状態が変化し、観察精度が低下してしまう。また、生体試料は水分や揮発性成分を含むため、観察中の脱水や分子再配置など経時変化が起こりやすく、正確な分子マッピングが難しかった。試料を化学固定して動きを抑える方法も一般的だが、その過程で分子本来の化学状態が変質する問題が残る。このような課題により、生体試料におけるラマン観察は、分解能、信号対雑音比、観察可能時間などで限界があった。

本研究では、これらの問題を一挙に解決する手段として、「クライオ・ラマン顕微鏡」の開発に成功した。本手法では、液体寒剤を用いて約 -185°C の極低温下で試料を急速凍結固定する。この操作により、生体試料内の分子は、細胞内環境をほぼそのまま反映した状態で凍結され、動きを停止する。これにより、観察中に分子が拡散したり構造変化を起こしたりすることが大幅に抑制される。また、低温状態そのものが試料の光損傷を軽減し、より強いレーザー出力や長時間の照射が可能となった。

我々は、開発したクライオ・ラマン顕微鏡を用いて細胞や組織を観察し、従来手法に比べて約8倍明るいラマン信号が得られることを確認した。さらに、長時間安定的な観察が行えるため、これまでは捉えられなかった分子種やその分布、分子の酸化還元状態などの微細な違いを、より高い空間・スペクトル分解能で可視化することにも成功した。様々な刺激下の細胞や組織内で起こる分子状態変化を初めて分光イメージングとして示すことが可能になり、ラマン顕微鏡によるバイオイメージングの新たな可能性が大きく拓かれた。

研究の意義と将来展望

本成果により、低濃度で存在する生体分子や、瞬時に変化する生命現象を高精度な分光画像として取得できる道が開かれる。これまで困難であった生化学反応の一瞬を「凍結」して観察し、分子の酸化還元状態など、生命活動の化学的な振る舞いに迫る解析が可能となる。また、凍結保存された細胞の非破壊評価や新規薬剤の作用メカニズム解明など、基礎医学/生物学・医療・薬学応用も期待される。このクライオ・ラマン顕微鏡は幅広い生命科学研究の発展を促し、持続可能な医療・バイオ産業の推進やSDGs達成にも寄与する先端的分光イメージング技術基盤として大きな役割を果たすと期待される。

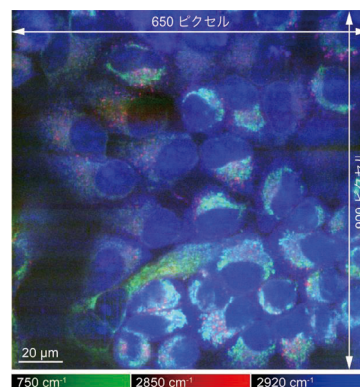


図1 急速凍結固定されたHeLa細胞（ヒト子宮がん細胞）の高信号対雑音比、広視野ラマン観察画像。観察時間は約10時間。画像中の緑色、赤色、青色はそれぞれシクロクロム（ 750 cm^{-1} ）、脂質（ 2850 cm^{-1} ）、タンパク質（ 2920 cm^{-1} ）の分布を示す。

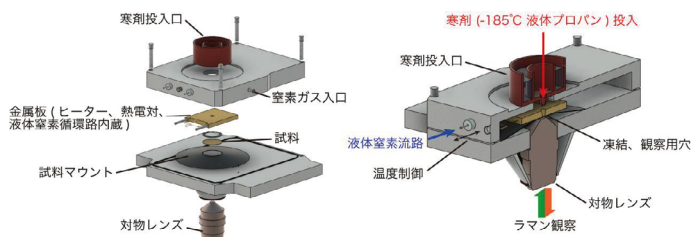


図2 開発したクライオ・ラマン顕微鏡の試料周辺図。細胞を培養したカバーガラスを試料マウント上に設置し、金属板を接触させる（左）。寒剤投入口と金属板の穴を通り寒剤が試料に接触し、試料を急速凍結固定する。金属板内のヒーターと液体窒素循環により試料の温度が制御される（右）。

特 許 PCT2件出願済み

論 文 Mizushima, Kenta; Kumamoto, Yasuaki; Tamura, Shoko et al. Raman microscopy of cryofixed biological specimens for high-resolution and high-sensitivity chemical imaging. Science Advances. 2024, 10, eadn0110. doi: 10.1126/sciadv.adn0110
Dodo, Kosuke; Fujita, Katsumasa; Sodeoka, Mikiko. Raman spectroscopy for chemical biology research. J. Am. Chem. Soc. 2022, 144,(43), 19651–19667. doi: 10.1021/jacs.2c05359

参考URL https://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/home_j.html

キーワード ラマン分光、ラマン顕微鏡、クライオ観察、分光イメージング