

温度センサーを必要としない新規細胞温度計の開発と応用

Development of a novel sensor-free cell thermometer and its applications

関西学院大学 重藤真介

温度は細胞の機能や活性に大きな影響を与える重要な因子であり、先端的な温度計測技術に基づいて細胞の温度感知・応答の分子機構を解明することは生命科学の目標の一つである。これまで細胞内の局所温度計測には蛍光性温度センサーが用いられてきたが、蛍光法には色素の退色や細胞毒性の問題のほか、生体分子の絶対温度を直接決定できないという原理的な制約があった。そこで本研究では、温度センサーを導入する必要なしに生きた細胞内の分子温度を計測することが可能な新しい細胞内温度計測技術「ラマン細胞温度計」の開発とその応用を目的とした。

ラマン散乱のアンチストークス対ストークス強度比 I_{AS}/I_S はボルツマン因子 $\exp(-h\nu/kT)$ に比例する。ここで h はプランク定数、 ν は振動数、 k はボルツマン定数、 T は絶対温度である。したがって、強度比 I_{AS}/I_S からラマン散乱を与える分子の絶対温度を直接的に決定することができる。しかし、ボルツマン因子は振動数 ν が大きくなるにつれて指数関数的に小さくなり、結果としてアンチストークス散乱光の検出が極めて困難となる。 I_{AS}/I_S の実測値から高い精度で温度を決めるためには、 ν が十分に小さい低振動数（典型的には $-200 \sim 200 \text{ cm}^{-1}$ ）領域のラマンスペクトルの観測が必須となる。本研究ではまず、ストークス・アンチストークス両方の領域で $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ までラマンスペクトルを測定可能な顕微ラマン分光装置を新たに構築した。励起レーザー光源として、発振波長 533 nm の全固体高出力小型レーザー（縦単一周波数発振モデル）を用いた。極めて狭いバンド幅を持つ体積ブラッグ回折格子と呼ばれる特殊な光学フィルターを導入することにより、超低振動数ラマンスペクトルの測定を実現した。装置の空間分解能は約 300 nm と見積もられた。

実測のラマンスペクトルから I_{AS}/I_S を正確に求めるためには、さらに装置の感度校正を行う必要がある。この感度校正を行うことにより初めて、回折格子の回折効率や CCD 検出器の量子効率などに依存しない、分子固有のラマン散乱強度を得ることができる。ラマン分光装置の感度校正法としては、標準光源や気体の回転ラマンスペクトルなどを用いる方法が知られているが、いずれも高倍率の対物レンズを使用する顕微分光光学系には適さないことがわかった。そこで、温度が既知の純水の低振動数ラマンスペクトルを用いて、強度比 I_{AS}/I_S の補正係数を求める方法を考案した。この方法には、各波長における強度補正係数は得られないという欠点があるが、分子温度の決定に必要な I_{AS}/I_S の補正は迅速かつ簡便に行えるという大きな利点がある。熱電対により測定した純水の温度から算出される I_{AS}/I_S の理論値を実測値で割ることで補正係数を求めた。得られた補正係数を用いて、様々な温度の純水の低振動数ラマンスペクトルからその温度を求めたところ、熱電対が示す温度との誤差は $0.3\text{--}1.7 \text{ K}$ となり、標準光源を用いる方法より格段に確度を向上させることができた。次に、この「ラマン温度計」を微生物（細菌）細胞の温度計測に応用した。 I_{AS}/I_S の正確な評価の妨げとなる自家蛍光を抑えるため最少培地中で培養した細胞の温度は室温において $21.0 \pm 0.3 \text{ }^\circ\text{C}$ となり、 0.5 K 以下の精度での温度計測に成功した。現在、真核生物のモデルである酵母細胞を用いて、細胞核と細胞質の温度の空間分解測定を進めている。

【参考文献】

- K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, and S. Uchiyama, *Nat. Commun.* **3**, 705 (2012).
- C.-F. Chang, H. Okajima, H. Hamaguchi, and S. Shigeto, *Chem. Commun.* **50**, 2945 (2014).