

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

(分子科学会推薦)

代表研究者 関西学院大学 重藤 真介 Kwansai Gakuin University Shinsuke SHIGETO

Temperature is one of the most fundamental physical parameters that affect cellular activities and functions. A variety of life phenomena including metabolism, immune responses, and tumor formation are closely associated with intracellular temperature. To elucidate the mechanism that enables individual cells to sense and respond to temperature, accurate measurement of intracellular temperature is required. Different types of “cellular thermometers” have recently been developed, but virtually all of them use an exogenous fluorescent temperature sensor and can determine intracellular temperature only in an indirect manner. In the present study, we develop a novel cellular thermometer that does not need any temperature sensor to be introduced into the cell. Our method utilizes anti-Stokes/Stokes intensity ratios in ultralow-frequency Raman spectra to directly evaluate absolute temperature of intracellular molecules with a submicron spatial resolution. We construct a confocal Raman microspectrometer that is capable of measuring Raman spectra at as low as $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$. For accurate temperature evaluation, intensity calibration of the microspectrometer is of critical importance. We propose a practical method for intensity ratio calibration using the Raman spectrum of liquid water whose temperature can be obtained with a thermocouple. With this method, we can achieve an accuracy of temperature determination comparable to a thermocouple. A preliminary temperature measurement on a living fission yeast cell shows that accurate removal of autofluorescence from the cell is just as important as the intensity calibration.

研究目的

温度は酸素濃度や pH とともに細胞機能および活性に大きな影響を与える重要な環境因子の一つである。温度は、細胞増殖、微生物による発酵、免疫機能の活性化、細胞のがん化など、様々な生命現象と深く関わっているが、個々の細胞が環境の温度を感知し応答するメカニズムの分子レベルでの解明はまだほとんど進んでいない。細胞の温度感知・応答機構を研究するためには、細胞内の温度を空間分解して精密計測する技術が不可欠である。近年、温度に依存して蛍光強度あるいは蛍光寿命が変化する種々の蛍光ナノ温度プローブが開発され、細胞内温度計測に用いられている[1-4]。しかしこの手法では、蛍光色素の退色やプローブ導入により細胞の生理状態が変化してしまう可能性がある。また、細胞抽出液や緩衝液中で蛍光プローブが示す蛍光強度/寿命と

温度との相関関係に基づいて温度を求めているため、絶対温度を直接決定できないという原理的な制約がある。本研究は、温度センサーを導入する必要なしに生細胞内の分子温度を計測することが可能な新規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する。

プローブを用いることなく細胞内の豊富な分子情報（分子の同定、分子構造、微視的環境などに関する知見）を得ることができる顕微ラマン分光法は、蛍光法に代わる生命科学研究の新たなツールとして注目されている。我々は顕微ラマン分光法を用いて、単一生細胞の体細胞分裂過程の化学イメージング[5,6]やバイオフィルムの非破壊解析[7]などの先駆的な研究を展開し、1細胞解析技術としてのラマン分光法の有用性を実証してきた。本研究ではこの顕微ラマン分光法を低振動数ラマン分光法と組み合わせ

ることにより[8]、サブミクロンの空間分解能で温度情報と分子情報を同時に取得できる革新的細胞解析法の創出を目指している。

研究経過

ラマン散乱のアンチストークス対ストークス強度比 $r = I(-\nu)/I(\nu)$ はボルツマン因子 $\exp(-h\nu/kT)$ と式(1)で関係づけられる：

$$r = [(\nu_0 + \nu)/(\nu_0 - \nu)]^3 \exp(-h\nu/kT) \quad (1)$$

ここで、 h はプランク定数、 ν_0 は励起レーザー光の振動数、 ν はラマン散乱光の振動数、 k はボルツマン定数、 T は絶対温度である。したがって、この強度比からラマン散乱を与える分子の絶対温度 T を決定することができる。しかし、ボルツマン因子は振動数すなわちラマンシフト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になる。アンチストークス対ストークス強度比から精度良く温度を決めるためには、レイリー散乱に近い低振動数ラマンスペクトルの観測が必須となる。本研究では、非常に狭いバンド幅を持つ体積ブラッグ回折格子 (volume Bragg grating, VBG) 型ノッチフィルターと呼ばれる特殊な光学フィルターを用いることにより、 $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ 付近まで測定可能な共焦点顕微ラマン分光装置を構築した (Fig. 1)。冷却加熱装置 (10021, Linkam Scientific) を顕微鏡ステージ上に搭載することにより、試料の温度を $-20 \sim 120 \text{ }^\circ\text{C}$ の範囲で変化させることができる。この装置のレイリー散乱除去能を評価するため、L-シスチンのラマンスペクトルを測定した。 $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$ のラマンバンドを、ストークス・アンチストークス両方の領域で明瞭に観測することができた。

実測の低振動数ラマンスペクトルからアンチストークス対ストークス強度比を正確に求めるためには、

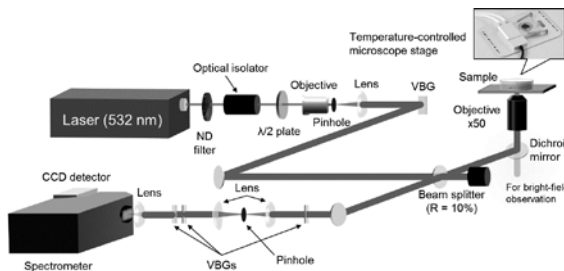


Fig. 1. Schematic diagram of the constructed confocal Raman microscope, which is capable of measuring Raman spectra at as low as $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$.

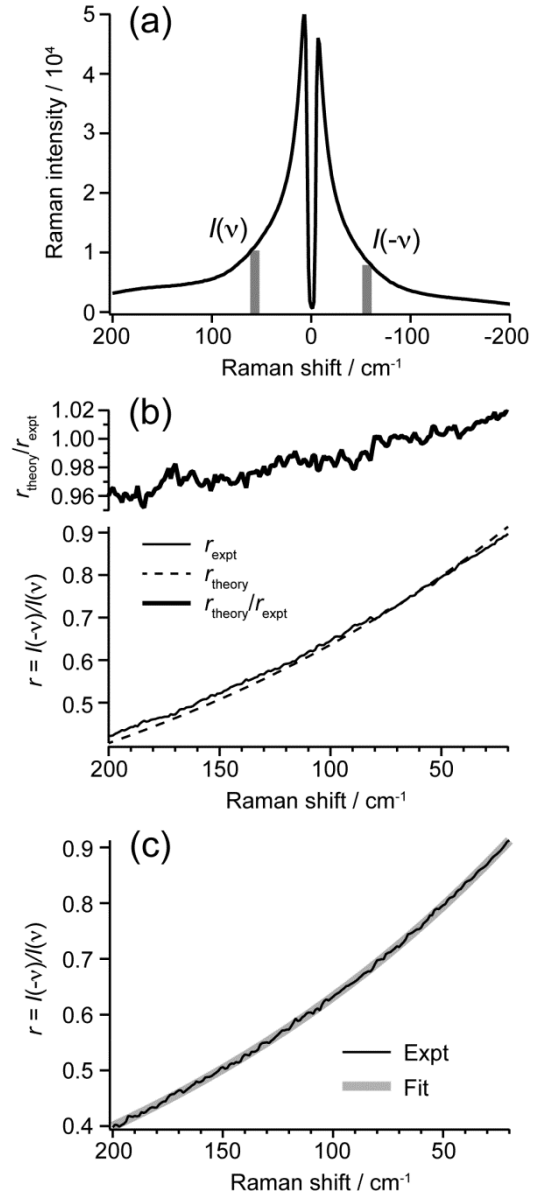


Fig. 2. (a) Observed low-frequency Raman spectrum of liquid water at $24.0 \text{ }^\circ\text{C}$. (b) Calibration of the intensity ratio r . Thin line, experimental curve; dashed thin line, theoretical curve obtained with Eq. (1); thick line, the ratio between the experimental and theoretical curves. (c) Fitted result (thick gray line) of the calibrated experimental intensity ratio (thin line).

分光装置の感度校正を厳密に行い、分光器中の回折格子の回折効率や検出器の応答に起因する感度の波長依存性を解消する必要がある。本研究ではまず、相対放射強度が既知の標準光源 (Intellical, Princeton Instruments) を用いる校正方法を検討した。この方法では、ラマン散乱光が発せられる点と同じ位置で標準光源を点灯させる必要があるが、Fig. 1 のような顕微鏡システムではそれが容易ではなく、正しい感

度校正が困難であることがわかった。一方、ラマンスペクトルそのものを使う感度校正法では、上記の問題点を回避することができる。Okajima と Hamaguchi は N_2 ガスの純回転ラマンスペクトルを強度標準として用いることにより、顕微ラマン分光装置の感度校正を行い、アンチストークス対ストークス強度比から精度良く水の温度を決定している[9]。しかし、この方法では N_2 の純回転ラマンスペクトルの測定に非常に長い時間 (>10 h) を要するだけでなく、細胞内局所の計測には必須となる高倍対物レンズでの測定が難しいという難点がある。

そこで我々は、より簡便で、かつ細胞計測への実装が容易な校正法として、細胞の主要構成成分である水の低振動数ラマンスペクトルを用いて、各ラマンシフト ν におけるアンチストークス対ストークス強度比 r の補正を行う方法を考案した。熱電対 (K タイプ) で温度を正確に測定した水 (室温に近い 24.0 °C とした) の低振動数ラマンスペクトル (Fig. 2a) から計算した r の実測値 r_{expt} で式(1)から予想される r の理論値 r_{theory} を割ることにより、低振動数領域の各ラマンシフトにおける「強度比補正係数」を求めることができる (Fig. 2b)。得られた補正係数はそのまま他の温度の水の強度比補正に適用可能で、補正後の強度比から、式(1)に従って絶対温度 T をフィッティングにより決定することができる (Fig. 2c)。3通りの方法 (すなわち、標準光源、本研究で考案した強度比校正法、感度校正なし) を用いて、アンチ

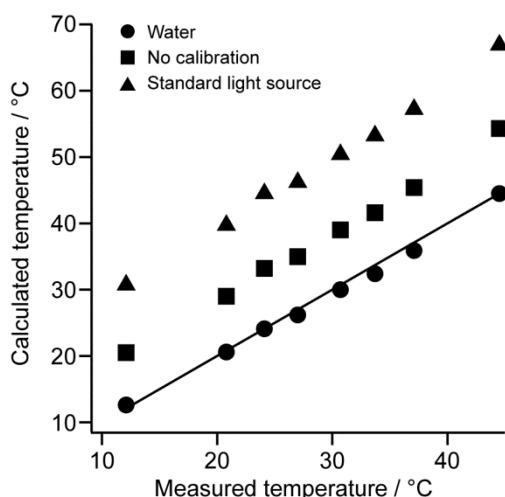


Fig. 3. Water temperature calculated using the anti-Stokes/Stokes intensity ratio vs. temperature measured with a thermocouple. Circles, our approach using the water Raman spectrum; squares, without any calibration; triangles, with a standard light source.

ストークス対ストークス強度比から種々の水の温度を求めた結果の比較を Fig. 3 に示す。我々の方法で求めた水の温度の誤差は 0.3~1.7 K で、使用した熱電対の精度 (1.5 K) を考慮すると、非常に正確な温度計測を達成できたと結論することができる。他の 2 つの方法では ~10 K 以上の大きな系統誤差が生じており、とくに標準光源による校正は精度が低かった。さらに、水溶液 (例えばグリセロール水溶液など) に対しても、同様の精度および精度で温度測定を行えることを確認した。

構築した超低振動数顕微ラマン分光装置を用いて、生きた分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 細胞内の空間分解ラマンスペクトルの測定を行った。Figure 4 からわかるように、細胞のラマンスペクトルは主に細胞内物質の自家蛍光に起因するバックグラウンドを示した。このバックグラウンドを正しく除去し、純粋なストークスおよびアンチストークスラマン強度を求めなければ、強度比の校正を行ったとしても妥当な温度が得られないことが明らかとなった。

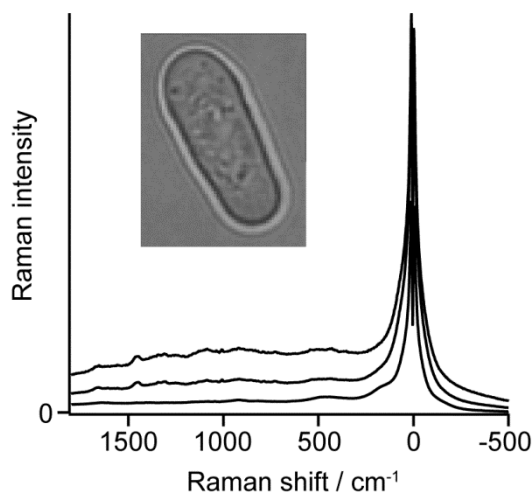


Fig. 4. Representative Raman spectra at three different locations within a living single *S. pombe* cell. The inset displays the optical micrograph of an *S. pombe* cell. These spectra exhibit different background patterns arising mainly from intracellular autofluorescent molecules.

考察

本研究で考案した水の低振動数ラマンスペクトルを用いるアンチストークス対ストークス強度比の校正法は、精度の面で標準光源を用いる校正法より優れていた。また、 N_2 の純回転ラマンスペクトルに基

づいた方法と比較すると、本手法は 20 分程度で行えることから、測定時間の点で遥かに有利であると言える。波長ごとの感度校正は不可能であるが、アンチストークス対ストークス強度比から温度を求めるといった目的を達成するうえでは十分である。

分裂酵母生細胞を用いた予備的実験から、自家蛍光によるバックグラウンドが細胞内温度計測の成否に大きな影響を及ぼすことがわかった。Figure 4 に示す分裂酵母細胞のラマンスペクトルは自家蛍光の少ない最小培地中で測定したものであるが、NADH やフラビンといった細胞内に存在する生体分子からの自家蛍光を抑えることは原理的に困難である。バックグラウンドの多項式フィットのような後処理、もしくはわずかに異なる 2 つの励起波長を用いた測定を行うなどの工夫が必要であり、現在これらの方法の検討を進めている。

参考文献

1. J.-M. Yang, H. Yang, L. Lin, *ACS Nano*, **5**, 5067 (2011).
2. K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, S. Uchiyama, *Nat. Commun.* **3**, 705 (2012).
3. K. Oyama, M. Takabayashi, Y. Takei, S. Arai, S. Takeoka, S. Ishiwata, M. Suzuki, *Lab Chip*, **12**, 1591 (2012).
4. G. Kucsko, P. C. Maurer, N. Y. Yao, M. Kubo, H. J. Noh, P. K. Lo, H. Park, M. D. Lukin, *Nature*, **500**, 54 (2013).
5. C.-K. Huang, M. Ando, H. Hamaguchi, S. Shigeto, *Anal. Chem.* **84**, 5661 (2012).
6. J.-F. Hsu, P.-Y. Hsieh, H.-Y. Hsu, S. Shigeto, *Sci. Rep.* **5**, 17541 (2015).
7. Y.-T. Zheng, M. Toyofuku, N. Nomura, S. Shigeto, *Anal. Chem.* **85**, 7295 (2013).
8. C.-F. Chang, H. Okajima, H. Hamaguchi, S. Shigeto, *Chem. Commun.* **50**, 12973 (2014).
9. H. Okajima, H. Hamaguchi, *J. Raman Spectrosc.* **46**, 1140 (2015).

研究の発表

口頭発表

1. Shinsuke Shigeto, “Utilizing Ultralow-Frequency Raman Spectra To Reveal Biomolecular Structure and Intracellular Environment”, 26th International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2018), Jeju, Korea (August 2018).

ポスター発表

1. 島端要典, 安田充, 重藤真介, 「超低振動数顕微ラマン分光法を用いた細胞内分子温度計測の試み」, 第 11 回分子科学討論会, 仙台 (2017 年 9 月)
2. Yosuke Shimabata, Mitsuru Yasuda, Shinsuke Shigeto, “Development of an Ultralow-Frequency Raman Microscope for Measurement of Intracellular Temperature”, 日本化学会第 98 春季年会, 船橋 (2018 年 3 月)
3. 吉川友貴, 島端要典, 安田充, 重藤真介, 「超低振動数顕微ラマン分光法を用いたバイオフィルム内の温度および分子クラウディングの評価」, 第 12 回分子科学討論会, 福岡 (2018 年 9 月)
4. 吉川友貴, 重藤真介, 「超低振動数ラマンイメージングによる生細胞内の分子クラウディングの評価と可視化」, 2019 年度日本分光学会年次講演会, 宇治 (2019 年 5 月).
5. Yuki Yoshikawa, Mitsuru Yasuda, Shinsuke Shigeto, “Evaluation of molecular temperature and molecular crowding using ultralow-frequency Raman microspectroscopy and its applications to living cells”, 10th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS 10), Auckland, New Zealand (July 2019). 発表予定