

# 深紫外分光分析による生体分子イメージング



熊本 康昭

## 1 はじめに

生命科学分野では分子の計測に蛍光が利用されている。蛍光を使う利点は、特定の分子を蛍光標識により特異的に観察できることである。しかし蛍光標識は分子の動きや機能に影響を与える可能性がある。またその過程において、固定や膜透過などの前処理を必要とすることが多い。すなわち蛍光観察では計測前から試料をその本来の姿から変えてしまっている可能性がある。このような背景のもと、標識や固定、膜透過処理などの試料前処理を必要としないラマン分光法、赤外吸収分光法、レーザー誘起ブレイクダウン分光法、紫外可視吸収分光法などの生体計測への応用が研究され、さらに近年これらの手法に顕微鏡技術を融合した非染色生体分子イメージング法の研究開発が進んでいる。本稿ではそれらの中から深紫外分光分析による非染色生体分子イメージング法に着目し、その基礎を解説し有用性を議論する。

## 2 深紫外分光分析

紫外光というと広義には波長 10~380 nm の電磁波のことを指す。このうち波長 10~200 nm を遠紫外光、波長 200~380 nm を近紫外光と呼ぶ。遠紫外域ではほとんどすべての物質が吸収帯を有している。水や大気中の酸素や窒素もその例外ではなく、遠紫外光は水中や大気中を伝播しない。それ故に、遠紫外分光による分析の対

象は主に物質界面であり全反射照明により行われる<sup>1)</sup>。これに対し近紫外域の水や大気中分子の吸収は小さく、近紫外光は生理環境下にあるバルク状態の生体試料の分析に利用される。

近紫外光のうち波長 300 nm 以下の光は特に深紫外光と呼ばれることがある。深紫外域は、一般に透明なものとして知られている多くのポリマーや有機溶剤にとって吸収波長域であり、分光学的情報に溢れている。深紫外光という言葉はおそらく、分光学にとって重要なこの波長域を他と区別するために、分光学分野において生まれたのではないかと筆者は考えている。

深紫外域には可視域において透明な生体分子も吸収帯を有する。その代表的なものは図 1 に示す核酸塩基とタンパク質アミノ酸である<sup>2)</sup>。これらの物質は、深紫外光を用いることにより感度よく分光計測できるようになる。生命科学分野でも核酸やタンパク質の定量分析は深紫外吸収分光により行われる。

物質の吸収帯は赤外域にもあるが赤外吸収は分子の振動や回転によるものである。これに対し深紫外吸収は電子励起状態への遷移によるものである。電子励起された物質のなかには輻射遷移すなわち発光によりエネルギー緩和するものがある。生体分子からの発光の場合それは自家蛍光とも呼ばれる。自家蛍光を利用することでも無標識の生体分子を感度よく計測できる。芳香族アミノ酸やそのアナログ体であるドーパミンやセロトニンなどが深紫外励起され効率よく自家蛍光を発する。トリプトファンの自家蛍光はそのスペクトルのタンパク質高次構造依存性から、タンパク質構造解析にも利用される。

吸収波長の光を物質に照射した場合にも当然ながら、吸収されない光子もある。吸収されない光子は物質を無視してすべて通り抜けるわけではなく、その一部は物質中の電子と相互作用し共振する。これにより物質には大きな分極が誘起され、光は強く散乱される。このような吸収波長における光散乱効率の増大は共鳴効果として知られている。共鳴効果は元来微弱なものとして知られるラマン散乱光を最大 10<sup>6</sup> 程度も増大する。ラマン散乱光は共鳴効果を考慮しても吸収や自家蛍光より微弱ではあるが分子構造に顕著に依存するため、生体分子の構造解析や物質の同定によく利用される。

## 3 生体分子イメージングへの応用

吸収、自家蛍光、共鳴ラマン散乱による生体分子の深紫外分光分析はいずれも古くから行われており、生命科学分野においても活用されている。一方で、深紫外分光分析を顕微鏡技術と融合した深紫外分光生体分子イメー

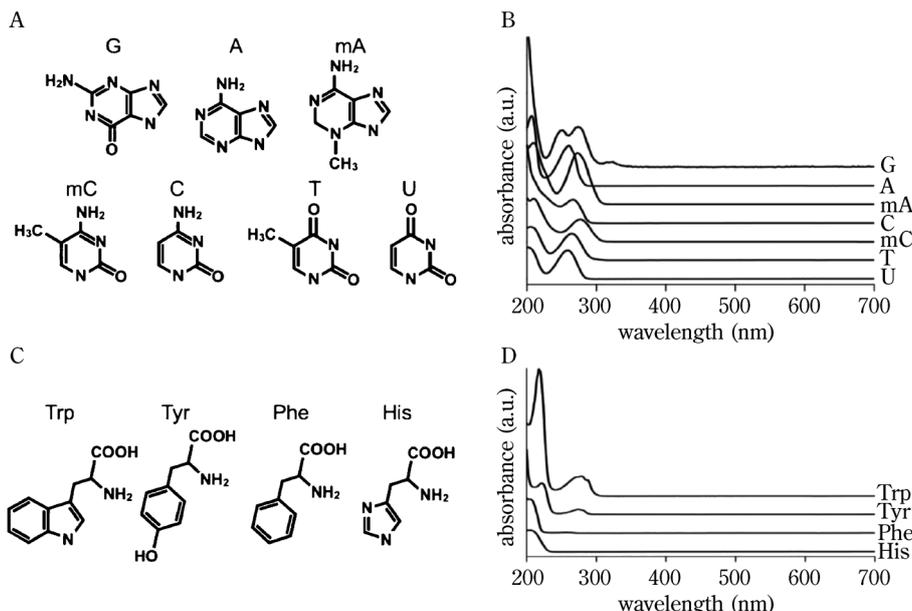


図 1 深紫外域において吸収を有し可視域において透明な生体分子。A, B) 核酸塩基の化学構造と吸収スペクトル, C, D) 芳香族アミノ酸の化学構造と吸収スペクトル。文献 2 より許可を得て掲載。

ジングの研究は近年行われるようになったいまだフロンティアの領域である。

この領域のバイオニクス的研究は2007年の深紫外吸収イメージング法の開発である<sup>3)</sup>。この方法では波長260 nmと波長280 nmで細胞を深紫外透過イメージング観察し吸光度画像を取得する。これらの吸光度画像には核酸とタンパク質だけが寄与しているとの仮定のもと、ランバート・ベールの法則に従い、核酸とタンパク質の濃度分布と細胞の光学的厚み分布とを未知行列とした連立行列方程式を立てる。この連立行列方程式の解として、核酸とタンパク質それぞれについて濃度分布の光軸方向への積分値すなわち二次元質量分布が求まる。算出された核酸、タンパク質の二次元質量分布画像と各波長において測定される吸光度画像の一例を図2に示している。最近では細胞の光学的厚み分布を算出できる深紫外定量位相イメージング法が報告され、生体分子濃度の細胞内二次元分布の算出も可能になっている<sup>4)</sup>。

光吸収は光音響効果により計測することもできる。光音響効果は吸収により発生する熱が試料を膨張させ超音波を発生させるという現象である。光音響信号すなわち超音波は試料内を減衰せず伝播するため、この方法では試料のより深部を吸収計測できる。

以上の吸収イメージングでは核酸塩基間あるいはタンパク質アミノ酸間のスペクトルの違いは無視している。その理由は、各塩基あるいは各アミノ酸の深紫外吸収スペクトルが互いに似通っており、それらの線型結合である細胞の深紫外吸収スペクトルにおける各塩基、各アミノ酸の寄与をそれぞれ定量評価することが難しいためである。

塩基レベル、アミノ酸レベルの物質同定を行うには自家蛍光および共鳴ラマン散乱が有用である。自家蛍光を用いた深紫外生体分子イメージング法は2009年Demosらにより<sup>5)</sup>、共鳴ラマン散乱を用いたものは2012年Kumamotoらにより<sup>6)</sup>、それぞれ報告されている。自家蛍光は生体組織のトリプトファンやチロシン、ドーパミンなどの芳香族アミノ酸やそのアナログのほか、コラーゲンの非染色分子イメージングに応用されている。一方の深紫外共鳴ラマン散乱は細胞内の核酸塩基イメージングのほか錠剤の薬剤分子イメージング分析への応用可能性が示されている。

生体分子イメージングにおいて深紫外分光分析を利用するメリットは高い空間分解能を得られる点にもある。光学イメージングの空間分解能は一般的に光の回折限界により制限される。光の回折限界は、レンズにより光をどれだけ小さい領域に集光できるかを意味しており、波長に比例する。そのため、可視光、赤外光それぞれの1/2~1/3、 $10^{-1}$ ~ $10^{-2}$ の波長の深紫外光を用いる光学イメージングではその波長の長さの分だけ高い空間分解能を得られる。

#### 4 課題と展望

光のもつエネルギーの逆数もまた光の波長に比例す

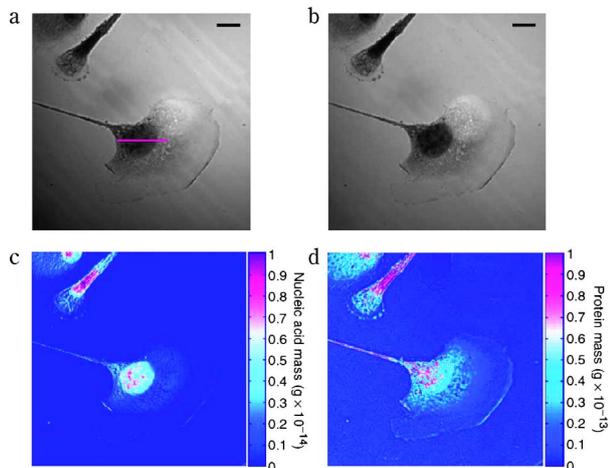


図2 深紫外光吸収による細胞分子イメージング。a, b)波長260 nm、波長280 nmの吸光度画像。c, d)吸光度画像をもとに算出される核酸、タンパク質の二次元質量分布画像。スケールバーは10 μm。文献3より許可を得て掲載。

る。すなわち深紫外光のもつエネルギーは可視光、赤外光の場合と比べてそれぞれ2~3倍、1~2桁高い。深紫外光と可視光とのエネルギーの違いはそれほど大きくないが、ラマン分光分析などの可視光による非染色分子分析法とは異なり、深紫外分光分析では試料による光吸収を伴う。つまり深紫外分光分析において試料は高いエネルギー状態に励起されダメージを受けやすい。このことは深紫外分光分析の生体応用における課題の一つである。試料のダメージは、信号を積算する測定分子数を増やせる場合には分子あたりの光照射を減らすことにより容易に回避される。しかし、顕微イメージングのように限られた試料分子から信号を積算する場合にはこのアプローチは使えない。さらに生きた試料は深紫外光に反応し撮像中に移動・変形してしまうという問題も生じる。

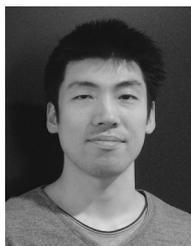
深紫外分光生体分子イメージングを活用するには試料ダメージの問題に対処する必要がある。これは容易なことではないが、深紫外分光生体分子イメージングでは、試料をイオン化しその信号を検出する質量分析法やレーザー誘起ブレイクダウン法といった破壊的分析法とは違い、試料のダメージを計測の必要条件とはしておらず、ダメージ抑制と測定を両立することが可能である。実際最近では深紫外光照射による試料ダメージを減らす方法が開発されている。ダメージの抑制方法がさらに進歩し確立すれば、より少ない分子からより多くの信号を積算できるようになる。このことは深紫外分光生体分子イメージングの高感度化や高解像度化などにつながる。

ダメージの抑制だけでなく、深紫外域の光学素子・デバイスの発展も今後のテーマの一つである。市販の光学素子・デバイスの多くは可視域用として設計・製造されており、深紫外域では十分な性能をもたない。深紫外域用の光学素子・デバイスは可視域用のものと比べて少なく、また性能も見劣る場合が多い。特にレンズの収差(=理想とのずれによる像の歪み)は大きく光透過率は小さい。このことは収差補正の難しさと関係しており、収差補正の難しさは深紫外域で透明なレンズ材料が少なく、しかもその波長分散が大きいため起因している。収差の他にも、短い波長を扱うため要求される面精度が高いことや、ビーム制御に最近よく利用される液晶光学素子は深紫外光を吸収してしまい利用できないことも、光学素子・デバイスの制約である。

以上の課題のため深紫外分光生体分子イメージングの有用性はまだ十分活かされていない。これは見方を変えれば、深紫外分光生体分子イメージングには発展の余地が大きいことを意味している。実際最近も新しい光源や対物レンズなどが様々発明されている。今後の深紫外分光生体分子イメージングの発展とそれによる生命科学分野の進展を期待している。

#### 文 献

- 1) I. Tanabe: "Far- and Deep-Ultraviolet Spectroscopy", Edited by Y. Ozaki, S. Kawata, p. 99 (2015), (Springer Japan).
- 2) Y. Kumamoto, A. Taguchi, S. Kawata: *Adv. Opt. Mater.*, **7**, 1801099 (2019).
- 3) B. J. Zeskind, C. D. Jordan, W. Timp, L. Trapani, G. Waller, V. Horodincu, D. J. Ehrlich, P. Matsudaira: *Nat. Methods*, **4**, 567 (2007).
- 4) A. Ojaghi, M. E. Fay, W. A. Lam, F. E. Robles: *Sci. Rep.*, **8**, 9913 (2018).
- 5) B. Lin, S. Urayama, R. M. G. Saroufeem, D. L. Matthews, S. G. Demos: *Opt. Express*, **17**, 12502 (2009).
- 6) Y. Kumamoto, A. Taguchi, N. I. Smith, S. Kawata: *J. Biomed. Opt.*, **17**, 076001 (2012).



熊本康昭 (Yasuaki KUMAMOTO)

大阪大学 大学院工学研究科物理学系専攻 応用物理学コース ナノフォトニクス領域 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)。  
大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻応用物理学コース 博士後期課程修了(2011年3月) 2011年3月 博士(工学)、指導教官:河田聡教授(大阪大学) <現在の研究テーマ>非染色生体分子イメージング技術の開発とその医学・生物学応用 <主な著書> "Deep-ultraviolet microscopy and spectroscopy, in Far- and Deep-Ultraviolet Spectroscopy", (Springer, Japan).

E-mail: kumamoto@ap.eng.osaka-u.ac.jp