

様 式 F-7-1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（令和元年度）

			機関番号	1 4 6 0 3
所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学		
研究 代表者	部局	研究推進機構		
	職	URA（チーフ）		
	氏名	中島 聡		

1. 研究種目名

基盤研究(C)(一般)

2. 課題番号

18K06163

3. 研究課題名

逆ラマン分光法による無標識で化学種特定可能な高速細胞イメージングシステム開発

4. 補助事業期間

平成30年度～令和2年度

5. 研究実績の概要

引き続き、基礎的なデータとして、単一の検出素子による光学系を構築して、その上で本システムによる検出限界のレベルを調べた。顕微光学系を構築し同軸で二色の光を入射し、面で検出するためにあえて励起光をdefocusさせて数十μmの領域が見えるような配置にした。検出には励起光を変調させて検出光信号強度変化を測定するため、（同期して変調される）励起光の漏れ光が最大のノイズとなりうる。光学系の精密設計によるノイズ除去や、コンピュータアルゴリズムックにロックイン検波を行う解析プログラムの開発により、リアルタイムで0.06%以下の強度変化を検出できる単一チャネルの逆ラマン顕微装置を開発できた。現状でも1素子・1波長あたり2秒でのこの精度での検出が可能である。この条件は、波長選択やアルゴリズムの現物に合わせた最適化、さらには光学系の改良によりさらに向上させることができることも確認した。この装置を用いて、脂質のモデル物質として水溶液中の油滴を用いた試料の本逆ラマン測定システムによる顕微観察に成功した。今回開発した単一素子を二次元検出器に置き換え、イメージング型の逆ラマン顕微鏡を目指して光学系置換を行っている。

研究室の移転作業のため、逆ラマン装置に必要なナノ秒高繰り返し波長可変レーザー光源が使用が制限されていた。その間、一般的な方法では定量が難しい二原子分子を無標識・非侵襲で同定・定量できるラマン装置を開発し、水素分子の同位体（D2, HD, H2）及び核スピン異性体（para, ortho）全てを一つのスペクトルで区別し・正確に定量できる。これを用いて、酵素（ヒドロゲナーゼ）による水素重水素同位体交換反応とパラ・オルト変換反応を追跡し、酵素内でのガス分子の挙動を調べることに成功し、その反応メカニズムを解明し論文に発表した。

6. キーワード

逆ラマン分光法

7. 現在までの進捗状況

区分	(3) やや遅れている。
理由	研究室移転作業に想定より時間を割かざるを得なかったこと、およびその移転に伴って主要レーザーの運転に支障が生じたこと。 セットアップは完了しているため、他のレーザーを用いた光学系のアライメントや、試料設定、画像取得のためのコンピュータプログラム作成などは順調に進んでおり、レーザーの不具合が解消されれば加速的に進めることを計画している。

8. 今後の研究の推進方策

今年度はじめに研究室移転作業をほぼ完了し、ナノ秒高繰り返し波長可変レーザー光源と逆ラマン顕微分光光学系の設置を完了した。また、本年度はシングルチャンネルであった顕微分光光学系に高速高分解能CMOS 2次元検出器を設置完了したので画像化を行っている。

(1) 高速高分解能 2次元CMOS検出器を用いた逆ラマン顕微分光光学システムの構築

本年度は昨年度完成させた単一素子による逆ラマン顕微分光光学システムに高速高分解能 2次元CMOS検出器を導入して、逆ラマン顕微像の検出を試みる。そのために、単一素子に特化していた光学系を像による検出可能な光学系へ組み替える。まずは、変調して利用している励起光由来の迷光を除去する光学系を構築する。励起光の漏れ光は巨大なノイズとなりうるが、単一素子の場合、励起光角度依存性を考慮する必要性が少なかったが、面で像を受けるとそれがcriticalになる。次にデジタル的にロックイン検波を行う解析プログラムの開発を行う。現在入手できる最速のCMOSでも16bitの深度の場合128X128素子で500Hzが最速である。これは約1GB/minのデータ量に相当し、これらを迅速に統計処理して画像化するため、高速かつ高効率のアルゴリズムを開発する。

(2) モデル系画像化と特性検出

脂質モデル系として水溶液中に分散した油滴を画像化する。水および油滴は現れるラマン線が全く異なるため、異なる 2 波長にそれぞれ固定したラマン像を取得し、光学顕微鏡画像との差異の比較検討を行う。この際、顕微像下の分布と実距離の比較から空間分解能に関する検出感度を算出する。脂質もであるが、水の場合そのクラスタ構造などミクロな環境によってスペクトル形が大きく異なる。このことは単に細胞内での分布だけでなく、形態などの指標として活用できる可能性を秘めている。

9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

測定システムの移設に伴う再設置作業を主に行って、該当レーザでの実験を行う予定であったが、レーザの不具合で実験の進行が遅れた。新規に改善・性能向上を行うための費用が次年度繰越となったため。

10. 研究発表（令和元年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawahara-Nakagawa Yuka, Nishikawa Koji, Nakashima Satoru, Inoue Shota, Ohta Takehiro, Ogura Takashi, Shigeta Yasuteru, Fukutani Katsuyuki, Yagi Tatsuhiko, Higuchi Yoshiki	4. 巻 28
2. 論文標題 New assay method based on Raman spectroscopy for enzymes reacting with gaseous substrates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 663～670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.3569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島聡、Li Chen、伊藤（新澤）恭子、小倉尚志、吉川信也
2. 発表標題 時間分解赤外分光法解析によるシトクロム酸化酵素の反応中間体プロトン移動機構
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

1 1. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件／うち取得0件）

1 2. 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

—

1 4. 備考

—