

Title	深紫外ラマン分光顕微鏡による細胞内生体分子分析
Author(s)	熊本, 康昭
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58317">https://hdl.handle.net/11094/58317</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【66】

氏名	くまもと やす 昭 熊 本 康 昭
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 24551 号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科精密科学・応用物理学専攻
学位論文名	深紫外ラマン分光顕微鏡による細胞内生体分子分析
論文審査委員	(主査) 教授 河田 聡 (副査) 教授 民谷 栄一 教授 萩行 正憲 准教授 橋本 守

#### 論文内容の要旨

本研究は、深紫外光照明による生体分子の共鳴ラマン散乱効果に着目し、深紫外ラマン顕微鏡を設計、構築して、細胞内生体分子の分光分析・イメージングを行った。

第1章では、細胞観察に深紫外共鳴ラマン分光を用いる利点を述べたのち、生体観察における深紫外ラマン分光の発展の歴史と現状を述べた。さらに、細胞の深紫外共鳴ラマンスペクトルの解析例を整理し、深紫外ラマン分光を用いて細胞から得られる化学情報を明らかにした。

第2章では、深紫外ラマン顕微鏡の一般的な特性について述べた。さらに、細胞内分子観察を目的として本研究において設計、試作した深紫外レーザーラマン顕微鏡について、実験的かつ理論的な側面から評価し、考察を行った。

第3章では、深紫外光と生体分子との相互作用についてまとめた。特に、深紫外共鳴ラマン分光で顕著に可視化される核酸塩基と芳香族アミノ酸に着目し、その光化学変化と光物理特性について、関連する文献を整理してまとめた。

第4章では、試作した深紫外ラマン顕微鏡を用いて、細胞内分子の分析を行った。励起光の照射時間を変えながら深紫外ラマン散乱分光測定を行い、深紫外光による細胞内分子の光化学変化を追跡した。その結果から、励起光の露光時間の増加とともに、核酸のプリン基とタンパク質の芳香族アミノ酸に帰属されるラマンバンドの強度が減少する一方で、光生成物由来のラマンバンドが出現し、その強度が次第に増加することを確認した。さらに、これらのラマンバンドの強度を解析し、励起光の強度と露光時間の関数として定量的に評価した。最後に、細胞内の生体分子の光化学変化を抑えつつ、細胞内の顕微観察領域から細胞内分子由来のラマンスペクトルを効果的に得るための観察条件を導きだした。

第5章では、導きだしたラマン観察条件のもと、細胞の深紫外顕微ラマン分光分析及びイメージングを行った。深紫外ラマン顕微鏡を用いてHeLa細胞を観察し、細胞内部における核酸とタンパク質の空間分布を分離することに成功した。さらに、HeLa細胞の核と細胞質から得られたラマンスペクトルの比較から、細胞核のスペクトルにおいて、核酸のプリン基に帰属されるラマンバンドが顕著に観察されることを見出した。

最後に本論文の総括として、本研究で得られた結果について考察し、深紫外共鳴ラマン分光による細胞の顕微観察の今後を展望した。

## 論文審査の結果の要旨

核酸とタンパク質は、細胞の機能発現（分裂、代謝、分子・イオン輸送、免疫など）において、中心的な役割を担う。本学位申請論文は、核酸とタンパク質の細胞内空間分布を観察することを目的として、深紫外ラマン分光顕微鏡を新たに開発し、ラマン散乱の電子共鳴効果を利用して、核酸の塩基とタンパク質の芳香族アミノ酸の細胞内分析を行なった研究をまとめたものである。その成果は以下に集約できる。

- 細胞内生体分子を観察するための深紫外ラマン顕微鏡を、光源、分光器、光学素子（レンズ、ミラー、フィルターなど）、検出器、試料ステージを最適にすることにより開発している。顕微鏡の空間分解能と検出効率を実験と理論から評価している。
- HeLa細胞のラマン観察を行ない、ラマンスペクトルの解析から、細胞内部の核酸塩基と芳香族アミノ酸だけが選択的に検出されたことを示している。また、スペクトルのラマンバンド強度に着目し、測定時間中にバンド強度が変化することを明らかにしている。バンド強度変化と励起光の照射条件との関係を定量的に評価した結果、細胞内生体分子が構造変化したことを明らかにしている。
- バンド強度の変化と励起光照射条件との関係を踏まえて、細胞の顕微観察に適した励起光照射条件を見積もり、細胞のラマンスペクトルの顕微マッピングを行なっている。得られたスペクトル画像を特異値分解処理することによって、細胞内の核酸塩基と芳香族アミノ酸の空間分布を得ている。その結果は、核酸塩基と芳香族アミノ酸の空間分布が異なり、細胞核に核酸塩基が高密度で存在することを示している。さらに、この結果を裏付けるために、細胞核と細胞質、それぞれから積算したスペクトルを比較している。その結果は、細胞核から測定したスペクトルにおいて、核酸塩基のバンド強度が大きい一方で、芳香族アミノ酸のバンド強度は細胞質と細胞核とから測定したスペクトルでは等しいことを表しており、スペクトル画像の核酸塩基と芳香族アミノ酸の空間分布と矛盾しないことを示している。

以上のように、本学位申請論文では、深紫外ラマン分光顕微鏡を構築し、細胞内の核酸塩基と芳香族アミノ酸の空間分布の観察手法を提案している。ラマンスペクトルが励起光照射条件に依存して変化することを示し、その変化が生体分子の光過程によって起きることを示している。これらの結果は、応用物理学、特に生体光学において寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。