

2P126

2 波長ピコ秒赤外超解像顕微鏡法による振動緩和ダイナミクスの測定(1) : 細胞部位ごとの変化

(東工大資源研¹・東工大統合研究院²)

○井上 圭一¹、植原 健¹、長谷川 貴一¹、酒井 誠¹、藤井正明^{1,2}

【序】 赤外スペクトルは分子構造や環境を鋭敏に反映し、これを顕微鏡に組み合わせた赤外顕微分光法は微小試料の赤外測定や特定分子のマッピングなど様々な応用が可能である。一方、赤外線波長の長さを反映して回折限界が大きいため、空間分解能が低く微小領域測定には原理的に適さない。そこで我々は、赤外分光法を、細胞を含む微細な試料に応用するために 2 波長ピコ秒赤外超解像顕微鏡法を開発した。赤外超解像顕微鏡法では、過渡蛍光検出赤外分光法をレーザー蛍光顕微鏡へ応用することによって微細な試料の測定が達成される。過渡蛍光検出赤外分光法は、第 1 の赤外レーザー光によって特定の振動に赤外励起した分子のみを第 2 の可視レーザー光により選択的に電子励起し、その結果生じる S_1 状態からの蛍光（過渡蛍光）を検出する分光法である。この方法では赤外光と可視光の重なり部分からのみ過渡蛍光が発生する事を利用し、赤外遷移を可視蛍光に変換して観測できる。可視光の回折限界は赤外光より遙かに小さいので、この方法を顕微鏡法に融合することで赤外超解像が達成される。

これまで我々は、赤外超解像顕微鏡法をローダミン 6G (R-6G) で染色したシロイヌナズナの毛根細胞に適用し、細胞の観察が可能である事を示すと同時に、細胞内における R-6G の振動緩和過程を観測する事に成功した。その結果、細胞内部では R-6G 分子に与えた振動エネルギーは 50 ps 経過しても散逸していない事を明らかにした。これに対し、重クロロホルム溶液中の R-6G は 20 ps 程度で振動エネルギーが完全に散逸した。これは細胞内の振動緩和ダイナミクスが溶液系とは大きく異なることを示唆する。細胞内部は細胞壁や核など多くの部位から構成されており、水分子など様々な分子と相互作用している。従って、R-6G の振動緩和が細胞内部と溶液系で異なったのは、色素のおかれた環境が異なる事に起因する可能性がある。そこで、我々は細胞内の様々な部位の振動緩和の観測を着想した。R-6G は細胞全体を染色するが、様々な細胞内プローブ蛍光色素を用いる事によって、部位特異的に染色を行いそこからの蛍光を観察する事ができる。例えば、DiO18 は細胞膜を選択的に染色し、SYTO24 は核を染色する。これらの色素を用い、特定の部位に吸着している色素分子の振動緩和の観測を行うことで、それぞれの部位ごとにおける振動緩和過程の違いを観察し、より詳しい知見を得る事を目指した。

【実験】 可視光と赤外光 2 色のピコ秒レーザーは、同軸から焦点距離 100 mm の CaF_2 レンズでそれぞれ 100 μm ϕ 、300 μm ϕ 程度の大きさに調節して集光し試料部全面へ照射し

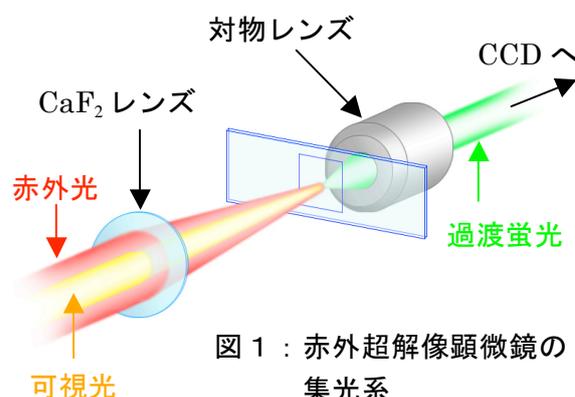
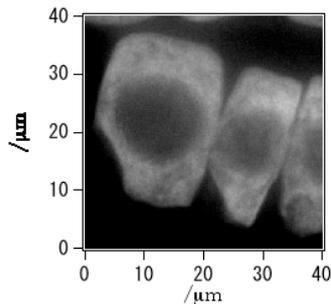


図 1 : 赤外超解像顕微鏡の集光系

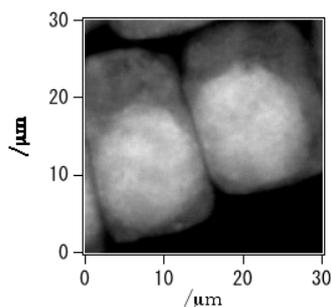
た。可視光の波長は 560 nm、赤外光の波長は $3\ \mu\text{m}$ ($3333\ \text{cm}^{-1}$) 帯でいくつかの波長を用いた。発生した蛍光を $\text{NA}=0.4$ の対物レンズを用いて背面から集め、焦点距離 2500 mm のレンズで ICCD へ結像した (図 1)。時間分解測定は光学遅延を用い、赤外光の照射に対し可視光の照射時間変えて測定を行った。

【結果と考察】 試料はタマネギの毛根細胞を塩酸処理により薄片化し、DiO18 または SYTO 24 で染色しプレパラート化した。図 2 にそれぞれの蛍光顕微鏡像を示す。DiO18 によって細胞膜が、SYTO24 によって核が染色されており、細胞内部の部位を選択的に染色することに成功した。これらの試料に赤外超解像顕微鏡法を適用し、振動緩和の測定を行った。図 3 に DiO18 で染色した細胞の、過渡蛍光像を時間分解測定した結果の一部を示す。赤外光+可視光によって生じる DiO18 の蛍光波長は 515 nm であり、対物レンズの NA から決まる空間分解能はおよそ $0.8\ \mu\text{m}$ である。実際に図 3(b)では核の輪郭を太さ $1\sim 2\ \mu\text{m}$ の線として認めることができ、この空間分解能は赤外波長と NA から決まる空間分解能 $5.4\ \mu\text{m}$ より遙かに小さい。従って、赤外光に対して超解像を達成している事は明らかである。ここで、図 3(b)に示した像と図 2(a)に示した像との比較を行うと、染色された領域からは過渡蛍光信号が検出されたが、染色されていない部分からの信号は検出されなかったことがわかる。従って、特定の部位を選択的に染色することで、細胞の部位ごとの過渡蛍光像を観測することができ、さらに、赤外光と可視光の遅延時間を調節することで、時間分解測定も可能である。この細胞に関しては 0 ps から蛍光が強くなり始め、1 ps で最も蛍光が強くなり、約 1.5 ps の時定数で減衰し、約 5 ps でエネルギーが完全に散逸した。この結果は、振動エネルギーが 50 ps 以上でも完全に散逸しなかった R-6G で染色されたものとは大きく異なる。一方、この過渡蛍光の時間発展が SYTO24 で核を染色した場合、大きく異なることも明らかになりつつある。講演では、SYTO24 で染色した細胞の時間分解測定の結果も示し、より詳細な細胞内振動緩和ダイナミクスの機構について議論する。

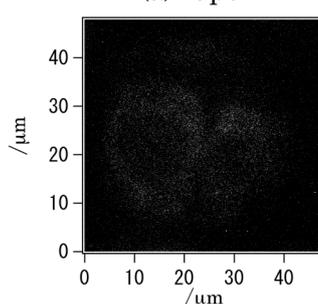
(a)DiO18 で染色した細胞



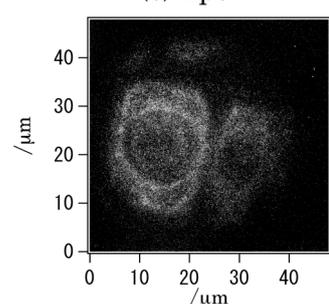
(b)SYTO24 で染色した細胞



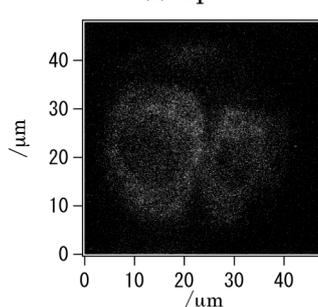
(a) -5ps



(b) 1ps



(c) 3ps



(d) 5ps

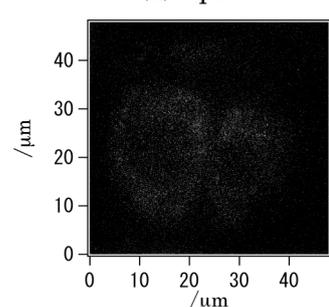


図 2 : 特定の部位を染色した細胞

図 3 : 過渡蛍光信号の時間変化