

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 (2) : 溶媒の振動共鳴条件下におけるローダミン 6G の緩和

(東工大資源研¹, 東工大統合研究院²)

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

【序】分子振動は分子の置かれた環境を敏感に反映し、それをもとに周辺の分子との相互作用についての知見を得ることができる。中でも赤外分光は分子の振動スペクトルを測定する代表的な手法として有用であるが、その波長の長さゆえに回折限界が大きく、細胞及びオルガネラなど微小領域の観察への応用は困難であった。そこで我々は赤外-可視の2波長分光法を用いた2波長赤外超解像顕微鏡法の開発を行った。この手法では赤外光で分子を振動励起した後に、本来の分子の $S_1 \leftarrow S_0$ の吸収波長より長い波長の可視光を入射させ、振動励起された分子のみを選択的に第一電子励起状態に遷移させることでそこからの発光(過渡蛍光)を観察する。このとき赤外光に対する可視光の入射のタイミングを変化させることで微小領域における振動緩和過程の観測を行うことができ、さらに赤外光の波長を変化させることで分子の赤外吸収スペクトルに相当するものを蛍光の強度変化として得ることができる。

この手法を用いて観測された、染色されたシロイヌナズナなどの植物細胞中のローダミン 6G (R6G) 色素の振動緩和ダイナミクスは、励起直後 1.5 ピコ秒で振動エネルギーの緩和が見られるものの、完全に緩和しきることはなく数百ピコ秒の領域でも R6G 分子内に振動エネルギーが残るというもので、これまでの溶媒中での振動緩和の研究から予想されるものとは大きく異なる結果が得られた。細胞内部は核や細胞壁など大きくの部位から構成されているほか、多くの水分子を含んでいる。そこで細胞中に存在する水分子が振動エネルギーの散逸過程に影響を与えているのではないかと注目し、本研究では H_2O 、 D_2O 、メタノールといった異なる溶媒中における R6G 色素の振動緩和ダイナミクスの測定を行い、細胞中での結果と比較することで R6G 分子の振動緩和過程に対する分子論的描像を明らかにすることを目指した。

H_2O などでは、溶媒による赤外光の吸収が大きいため透過する距離が極端に短く、通常の分光測定で過渡蛍光を観測することは難しい。そこで我々は2波長赤外超解像顕微鏡法を用いること

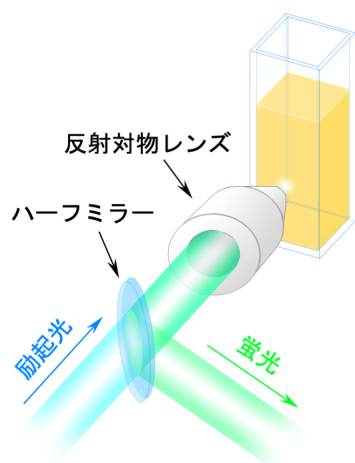


図1 反射対物レンズを用いたセル表面近傍からの蛍光観察

で、試料セル表面のごく近傍 (< 10 μm) の領域に光を集光し、そこからの蛍光を集めることで、溶媒の強い赤外吸収に妨害される前に信号を抽出できると考え、これらの溶媒中で溶媒の振動共鳴条件下における過渡蛍光検出を行った(図1)。

【実験】励起光源としての赤外光と可視光は再生増幅器によって増幅された Ti:Sapphire レーザーのピコ秒パルスをもとに波長変換することによって得られ、それぞれの波長は 3100-3800 nm ($2632\text{-}3226\text{ cm}^{-1}$) および 598 nm とした。これらの光はビームコンバイナーによって同軸化され、反射対物レンズを用いてサンプルセル表面付近の溶液上に集光した。出てくる蛍光は同じ反射対物レンズを用いて平行光線化したのち、ICCD カメ

ラ上に結像させることによって検出した。サンプルは R6G 分子を H₂O、D₂O、メタノールなどの溶媒に溶かしたものを、濃度を 10 μM 程度とした。

【結果と考察】図 2 に H₂O 中での R6G 色素の過渡蛍光像を示す（可視光：598 nm、赤外光：3300 nm (3030 cm⁻¹)）。H₂O 中ではこの波長における赤外光の吸収が大きく（図 3）、通常の光学系では透過する長さが極端に短くなるため（数十 μm 程度）蛍光セルを用いて光軸の直角方向から蛍光を集光する通常の光学系では、過渡蛍光像の観察は難しい。しかし今回、反射対物レンズを用いた赤外超解像顕微鏡法を適応することによってセル表面近傍からの蛍光像の観察に成功した。可視光と赤外光のタイミングを変化させた過渡蛍光像を時間分解画像化し、中心部分の強度変化を時間に対してプロットしたものを図 4 に示す。これを見ると赤外光より可視光が早く入射する負の時間領域において過渡蛍光信号は見られないが、*t*=0 以降では強い蛍光信号が得られている。また細胞中で測定されたものと同様に、10 ピコ秒以上の長時間においても振動エネルギーが緩和しきらずに残っており、500 ピコ秒まで測定領域を広げてもこの信号が減衰することはなかった。このことから R6G の振動緩和過程は細胞の中だけでなく H₂O 溶液中の分子でも非常に遅いことがわかった。

同様の測定を同じように 3000 cm⁻¹ 領域に強い赤外吸収をもつ、水素結合性の溶媒であるメタノール中に行ったところ、H₂O と同様に 10 ピコ秒より長い時間でも振動エネルギーは散逸しなかった。これに対し、溶媒の吸収がない D₂O では過渡蛍光信号は最初の数ピコ秒で完全に緩和し切ってしまう、10 ピコ秒以降に過渡蛍光信号は見られなかった。このことから R6G 分子の振動緩和過程は周りの分子の影響を大きく受けることが分かる。また H₂O 中での測定において、赤外光の波長を 3300 nm (3030 cm⁻¹) から溶媒の吸収の強い 3100 nm (3226 cm⁻¹)（図 4）にしたところ、最初の数ピコ秒に見られた強い蛍光が消失し、測定時間全体にわたって比較的弱い蛍光信号が観測され（図 4）、同じ溶媒中でも赤外光の波長によって振動緩和ダイナミクスに違いが見られた。

発表ではこれらの結果とあわせて、その他の溶媒中での振動共鳴条件下における R6G の結果などをもとに細胞中で見られた R6G 分子の長時間における振動緩和過程についての考察と、振動緩和過程に影響を与える分子間相互作用についての議論を行う予定である。

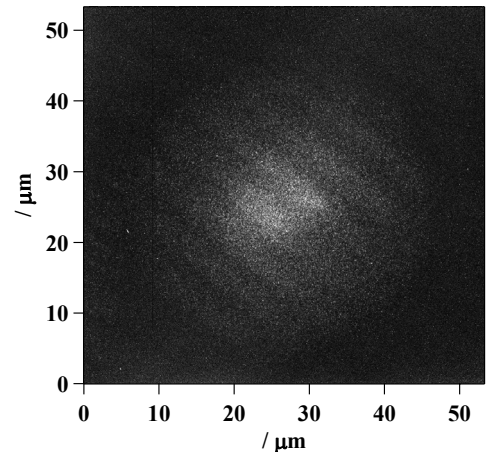


図 2 H₂O 中の Rhodamine 6G 色素の過渡蛍光信号像

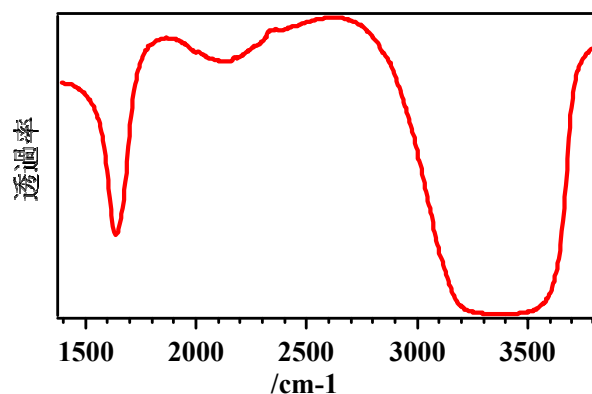


図 3 H₂O の赤外透過スペクトル

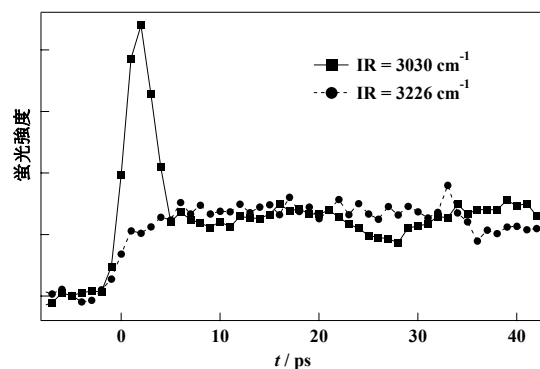


図 4 H₂O 中の Rhodamine 6G 色素の過渡蛍光信号強度の時間発展および赤外光波長依存性