

赤外超解像顕微鏡法を用いた非染色非発光性細胞の赤外イメージング

(東工大資源研) ○井上 圭一, 小暮 聡, 植原 健, 藤井 正明, 酒井 誠

【序】赤外分光法は分子振動スペクトルを測定することで、対象とする分子の構造およびその分子が置かれた環境に対する数多くの情報を得ることができ、これまで数多くの研究がなされてきた。その中で、近年生細胞やナノ空間など微小領域における分子の振動情報に対する興味が強く持たれている。しかし、赤外光は可視光と比べて回折限界が大きく、現状の赤外顕微鏡では波長と同程度（数～数十 μm ）の分解能しか得ることが出来ない。従って例えば生体試料の場合、組織レベルでしか観察が行えず、従来の可視光を用いた顕微鏡法と比べて応用が遅れている。

これに対して、我々はこれまで2波長レーザー分光法的一种である過渡蛍光検出赤外分光法（TFD-IR法）をレーザー蛍光顕微鏡に応用した、赤外超解像顕微鏡の開発を行ってきた。この方法では赤外励起された分子のみからの可視蛍光を観察するため、可視光の分解能で赤外吸収に関する情報を得ることができる。実際我々はこの手法を用いて蛍光色素で染色された細胞に対し、赤外光の回折限界より優れた分解能で細胞中の赤外吸収をマッピングし、さらに色素の振動緩和過程をピコ秒の時間分解能で観測することに成功した(1)。しかしTFD-IR法は蛍光性の試料にしか適用できず、大部分が蛍光を發さない生体分子の振動情報を得ることは困難である。そこで今回我々は非蛍光性分子に応用が可能な新規赤外超解像顕微鏡の開発を行った。

赤外光によって振動励起された分子は、さらに可視光を照射することで、より振動数の高いAnti-Stokes Raman (ASR) 散乱光や和周波発生光 (SFG 光) を發する(図1)。これらの発光には可視領域に発色団を持たない分子を含め、全ての化学種が寄与すると期待され、さらに可視の波長を持つことから、赤外光に対して超解像を達成することが可能である。

この中でASR信号は振動励起された分子のポピュレーションを直接観測することができ、入射する赤外光の波長を変えながら発光強度を観測することで、分子の赤外吸収スペクトルに相当する情報を得ることができる。また従来のTFD-IR法と異なり、分子が振動緩和して低振動準位に遷移すると、それに対応するASR信号も得られ、その時間変化を追うことによって、daughter levelのポピュレーション変化のダイナミクスも観察することが可能であり、分子の振動緩和過程についてより完全な情報を得ることが期待される。

一方、細胞の膜表面など非対称な環境においては、赤外光と可視光を分子に同時に照射するとそれらの振動数を足したものに相当するSFG光が得られる。SFG信号は界面など局所的で特異な環境における分子の赤外吸収に関する情報を含んでおり、細胞内部など試料全体の情報を反映したASR散乱と併せて、より包括的な情報を同一の測定系で得ることができる。

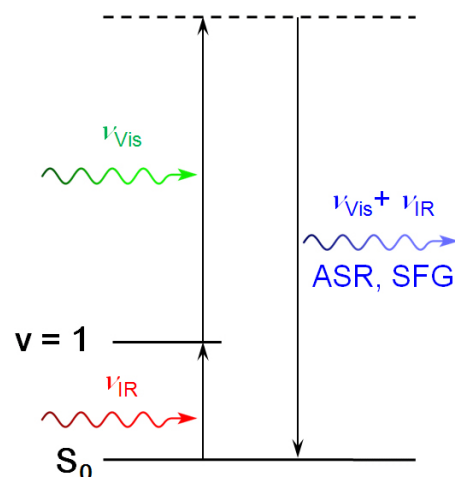


図1 赤外励起によるASR散乱光および和周波発生エネルギーダイアグラム

【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で波長変換することで得られ、それぞれの波長を 2800-3500 nm ($2857\text{-}3571\text{ cm}^{-1}$) および 610 nm (16393 cm^{-1})、強度を $7\text{ }\mu\text{J/pulse}$ および $1\text{ }\mu\text{J/pulse}$ 程度とした。これらの光をビームコンバイナーによって同軸化し、 CaF_2 レンズ ($f=100$) を用いて、サンプル上に照射した。発光は背面から対物レンズ (N. A. = 0.4) を用いて集め、ノッチフィルターおよびバンドパスフィルター、赤外カットフィルターを通した後、結像レンズにより ICCD カメラ上に結像した。試料にはタマネギ根毛細胞を用い、塩酸処理後薄片化しプレパラートに封入した。

【結果と考察】図 2 に可視光 (610 nm) および赤外光 ((b) 3300 cm^{-1} 、(c) 3030 cm^{-1}) を入射したときのタマネギ根毛細胞からの発光像を示す。 3030 cm^{-1} では主として脂肪族性の C-H 伸縮振動が励起されるが、この場合には細胞全体から発光が観察された (図 2(b))。それに対し 3300 cm^{-1} では主に芳香環の C-H 伸縮および N-H 基の伸縮振動が励起されるが、この場合ところどころに強いスポット状の発光がみられ (図 2(c))、それぞれの赤外波長において分布に違いが見られた。そして両波長とも細胞核の部分から特に強い発光が得られた。またさらにこの発光を光路上に Flipping mirror を置き、分光器に導入することで同一の測定条件でのスペクトルの観測も行った。そのようにして得られた発光スペクトルが図 2(d) および (e) である。これを見ると得られた発光は入射した可視光に対して高振動数側に現れており、ちょうど赤外光と可視光の振動数の和に対応する振動数にピークを持っていることが分かる。さらにその幅は 26 cm^{-1} とレーザー線幅に近い非常に狭いものであった。このことから、得られた信号は主に SFG 発生光によるものであることがうかがえる。発表ではさらに得られた発光に対するより詳しい考察を時間分解測定などのデータとあわせて報告する予定である。

(1) Sakai et al., *Chem. Phys. Lett.* (2007) **439**, 171-176.

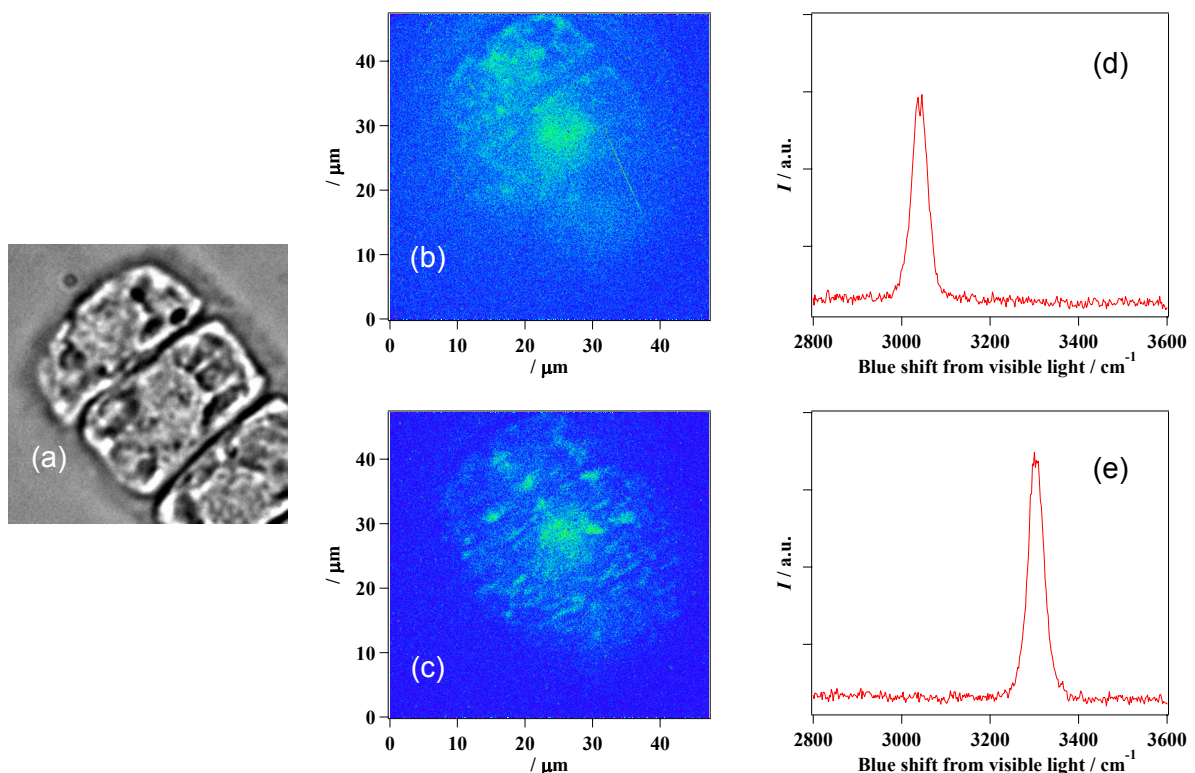


図 2 タマネギ根毛細胞の透過像 (a)。同一の細胞に $\nu=3030\text{ cm}^{-1}$ (b) および 3300 cm^{-1} (c) の赤外光と可視光 (610 nm) を入射した場合の発光像とその発光スペクトル (d)、(e)