

1P-088

電子共鳴三次和周波発生法の開発と生体分子への応用

(東大院・理¹、マックス・プランク研究所²、筑波大院・数物³、NCTU 分子科学研究所⁴)

瀬川尋貴¹、奥野将成²、加納英明³、濱口宏夫^{1,4}

Development of electronic resonance third-order sum frequency generation and its application to biological molecules

(The University of Tokyo¹, Max Plank Institute², The University of Tsukuba³, NCTU Institute of Molecular Science⁴) Hiroki Segawa¹, Masanari Okuno², Hideaki Kano³, Hiro-o Hamaguchi⁴

【序】生命科学の発展において、生物の構成要素の最小単位とも言える単一細胞内における生体分子の時空間局在や反応機構を理解することは極めて重要である。それらを明らかにする非常に強力な手法として、イメージング技術が広汎に用いられている。特に、得られる信号を分光し、細胞内の各点から得られる多数のスペクトルを元に生体分子の量、構造変化、反応についての情報を得る分光イメージング技術は大きな注目を集めている。前回、我々は三次和周波発生(Third-order Sum Frequency Generation; TSFG)という新しい方法を用いた TSFG イメージングの報告を行った[1]。本発表では、TSFG を拡張した、電子共鳴マルチプレックス三次和周波発生法の開発について報告する。

TSFG は、三次の非線形光学過程のひとつであり、二種以上の異なる波長の励起光により生じる、三光子和周波発生過程である(図 1)。励起光として単色光に加え、広帯域白色光を用いることで、TSF をスペクトルとして検出できる。この信号波長域に一光子共鳴を持つ分子を試料として観察すれば、得られる TSF スペクトルにはその分子の電子情報が含まれていると考えられる。本研究では、近赤外サブナノ秒パルス光を利用したマルチプレックス TSF 分光顕微鏡を製作し、生体分子の一つであるヘモグロビンを観察した。

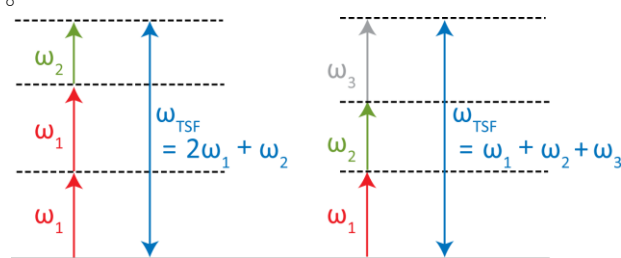


図 1 TSFG のダイアグラム

【実験】右に、本研究で製作した装置を示す(図 2)。光源には、Q スイッチ発振 Nd:YAG レーザーを用いた。基本波 1064 nm の光は最初に二分割され、一方はそのまま励起光(ω_1 光)として、もう一方はフォトニック結晶ファイバ(Photonic crystal fiber; PCF)へ導入し、白色光に変換した後近赤外成分(1100 – 1600 nm)のみを取り出し、励起光(ω_2 光)とした。これらを正倒立顕微鏡に導入し、ピエゾステージ上に載せられた試料に集光する。発生する信号光はもう一つの対物レンズによりコリメートされた後、TSF 信号が含まれる可視域のみを検出系へ導入する。

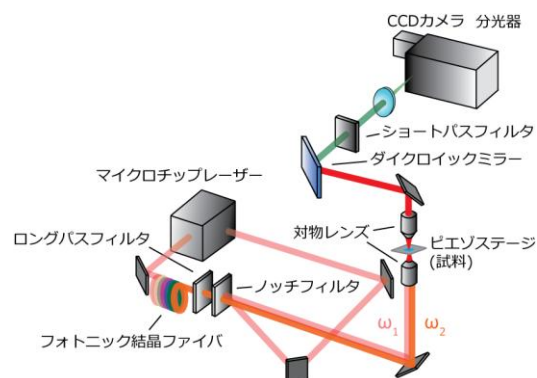


図 2 開発した装置の概略図

試料には、酸化型ヘモグロビン、還元型ヘモグロビンをリン酸緩衝液(phosphate buffered saline; PBS)に溶解した溶液を用いた。対照実験として、TSF 信号波長域に共鳴を持たないタンパク質であるアルブミンを PBS に溶解した溶液も測定した。対物レンズを用いた強い集光条件下では、TSF は光学的性質(屈折率、非線形感受率等)の不均一な部分でのみ信号を生じる。そこで、本研究では 20 μm のビーズをスパーサーとし、溶液を二枚のカバーガラスで封じ、試料とした。これを鉛直方向(カバーガラス面に対して垂直)にスキャンし、カバーガラス/空気界面と、カバーガラス/溶液界面で生じる TSF 信号を取得し、解析に用いた。

【結果と考察】 図 3(a)に、各試料溶液の吸収スペクトルを示す。アルブミン溶液は吸収を持たないが、酸化型・還元型ヘモグロビン溶液はピーク位置の異なるブロードなピークを持つ。従って、得られる TSF スペクトルについて、このピーク波長付近での変化が期待される。

TSF は三次の非線形光学過程であり、本実験における電子共鳴条件下では、対応する非線形感受率は、

$$\chi_{total}^{(3)} = \chi_{resonant}^{(3)} + \chi_{nonresonant}^{(3)}$$

$$\chi_{resonant}^{(3)}(\omega_{TSF}) = \sum_{k,j} \frac{N\mu_{0l} \mu_{lk} \mu_{kj} \mu_{j0}}{\hbar^3 (\omega_{l0} - (\omega_3 + \omega_2 + \omega_1) - i\gamma_{l0}) (\omega_{k0} - (\omega_2 + \omega_1) - i\gamma_{k0}) (\omega_{j0} - \omega_1 - i\gamma_{j0})}$$

として表される。共鳴による効果を抽出するために、カバーガラス/溶液界面で得られた TSF スペクトルを、カバーガラス/空気界面で得られた TSF スペクトルで割り、TSF ratio スペクトルを算出すると、図 3(b)に示す結果が得られた。図から分かるように、吸収ピークが存在する 400 nm 付近には明瞭な差が見てとれる。スペクトルには非共鳴項由来と思われる右肩上がりのベースラインが乗っているが、フィッティングにより差し引くと、図 3(c)のような結果が得られ得た。酸化型・還元型の TSF ratio スペクトルは吸収スペクトルと同様のピーク位置の傾向を示しており、電子共鳴 TSFG により、生体内分子の電子状態を直接的に測定できることが示された。

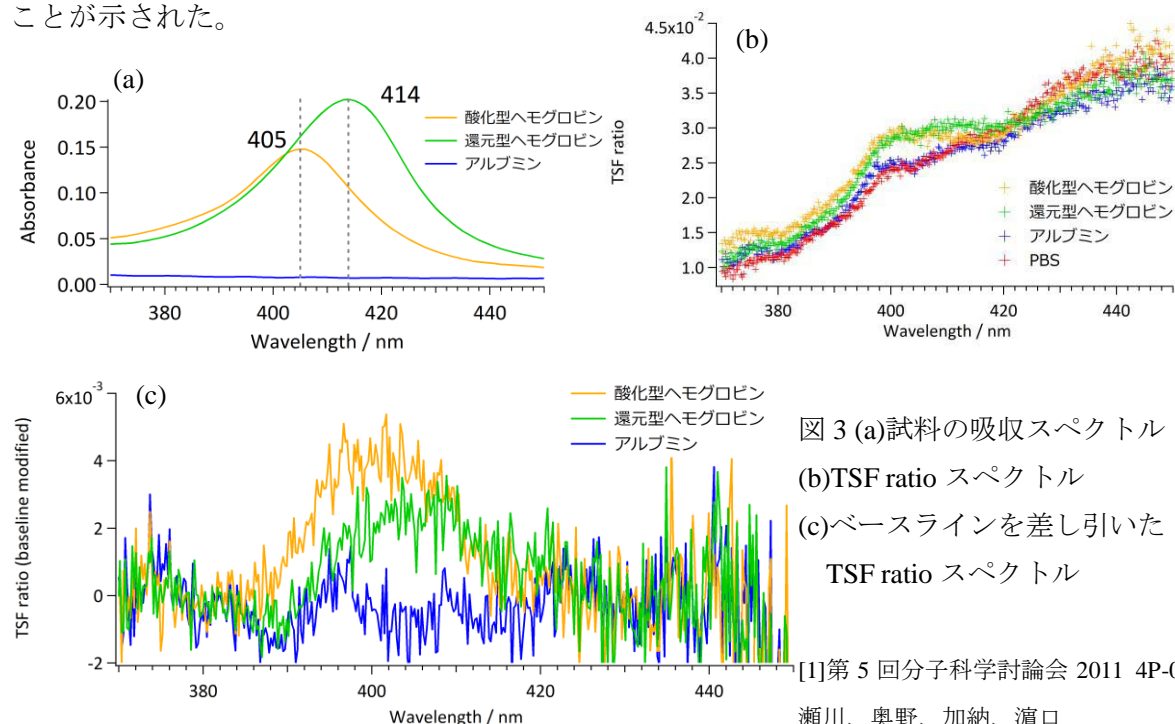


図 3 (a)試料の吸収スペクトル
(b)TSF ratio スペクトル
(c)ベースラインを差し引いた
TSF ratio スペクトル