

## 2D11

### VSFG 検出赤外超解像顕微鏡による毛髪 $\alpha$ -ケラチンの分子配向観察

(東工大・資源研<sup>1</sup>, 北里大・理<sup>2</sup>, 花王・ビューティケア研<sup>3</sup>)

酒井誠<sup>1</sup>, 牛尾公平<sup>1,2</sup>, 長瀬忍<sup>3</sup>, 平野祐司<sup>3</sup>, 伊藤隆司<sup>3</sup>, 石川春樹<sup>2</sup>, 藤井正明<sup>1</sup>

### Observation of molecular orientation of human hair $\alpha$ -keratins by VSFG detected IR super-resolution microscopy

(Tokyo Tech.<sup>1</sup>, Kitasato Univ.<sup>2</sup>, Kao Corp.<sup>3</sup>) Makoto Sakai<sup>1</sup>, Kohei Ushio<sup>1,2</sup>,  
Shinobu Nagase<sup>3</sup>, Yuuji Hirano<sup>3</sup>, Takashi Itou<sup>3</sup>, Haruki Ishikawa<sup>2</sup>, Masaaki Fujii<sup>1</sup>

【序】毛髪はケラチタンパク質からなる直径 30 ~ 120  $\mu\text{m}$  程度の階層構造をもつ繊維であり、中心部がメデュラ、外側を覆っている薄い層がキューティクル、メデュラとキューティクルの間の毛髪の 85 % 以上の大部分を占めるのがコルテックスである (図 1 : 毛髪横断面参照)。コルテックス領域では、 $\alpha$ -ヘリックス構造のケラチタンパク質 ( $\alpha$ -ケラチン) が繊維状に集合して中間径フィラメント (IF) を形成し、毛髪の伸長方向にファイバー状に並んでいることが知られている[1]。我々は、昨年の分子科学討論会において、振動和周波発生 (VSFG) 検出赤外超解像顕微鏡

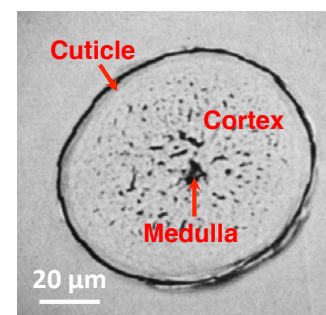


図 1 : 日本人毛髪横断面の透過像 (試料の厚さ : 3  $\mu\text{m}$ )

を用いて、毛髪横断面の超解像赤外分光イメージングを行い、アミド III バンド ( $1250\text{ cm}^{-1}$ ) においては高感度で  $\alpha$ -ケラチンが検出される一方、アミド I バンド ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) においては  $\alpha$ -ケラチンが全く観測されないことを報告した。アミド I バンドは主に C=O 伸縮振動モードに対応し、アミド III バンドは C-N 伸縮振動モードに対応することを考慮すると、 $\alpha$ -ケラチンでは両者の振動モードはほぼ直交な関係にあり、 $\alpha$ -ケラチンがアミド III バンドのみ検出可能な毛髪伸長方向に沿って配向している、即ち、分子配向が VSFG 発光強度に大きく影響を与えたと結論した[2, 3]。

本研究では、まず第 1 に、上述の我々の結論通りに  $\alpha$ -ケラチンの分子配向が影響してアミド I バンドが観測されなかったのか否かを検証するために、毛髪伸長方向に対して垂直にカットした横断面だけではなく、斜め断面あるいは縦断面においても超解像赤外分光イメージングを行い、毛髪伸長方向の直交軸に対する角度 (=  $\alpha$ -ケラチン分子配向の向き) と VSFG 像の信号強度の相関を調べた。また、 $\alpha$ -ケラチンの分子配向について詳細な議論をするために、偏光依存性も併せて測定した。VSFG 法は 2 次の非線形光学過程であり、非線形感受率  $\chi^{(2)}$  に依存する。 $\chi^{(2)}$  は、分子配向をあらわに表す分子の超分極率  $\beta$  および VSFG 発光、可視光、赤外光の 3 つの偏光の組み合わせに依存するため、偏光依存性測定により詳細な解析が期待される。

【実験】励起光源に使用した赤外光と可視光は、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変換することで得られ、それぞれ赤外光 5-9  $\mu\text{m}$  ( $1111\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ ) および可視光 613 nm の波長を用いた。これらの光をビームコンバイナーで同軸に合わせた後、BaF<sub>2</sub> レンズ (焦点距離 : 50 mm) を用いて直径約 100  $\mu\text{m}$  の大きさで毛髪試料に照射した。試料

からの VSFG 発光は背面から長作動対物レンズ (NA = 0.4) を用いて集め、赤外カットフィルター、バンドパスフィルターを通した後に結像レンズにより ICCD カメラ上に結像した。毛髪試料には、日本人毛髪をエポキシ樹脂に包埋した後、マイクロトームで毛髪伸長方向の直交軸に対して様々な角度 ( $\alpha = 0 \sim 90^\circ$ : 図 2 参照) で断面を切り出しカバーガラス基板上に載せ、エタノールで馴染ませることにより基板上に半固定したものをを用いた。毛髪試料の厚さは全て  $3 \mu\text{m}$  で調製した。

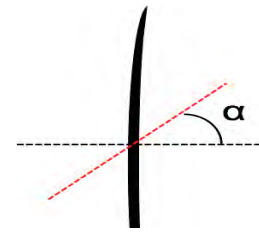


図 2: 毛髪斜め断面の角度  $\alpha$ .  $0^\circ$  は横断面、 $90^\circ$  は縦断面に相当する。

【結果と考察】毛髪伸長方向の直交軸に対して様々な角度でカットした毛髪断面に VSFG 法を適用し、アミド I バンド ( $1650 \text{ cm}^{-1}$ ) において超解像赤外イメージングを行った結果を図 3 に示す。 $\alpha = 0^\circ$ 、即ち、横断面では、VSFG 像が全く観測されないが、 $\alpha$  を大きくしていくとコルテックス領域から VSFG 発光が微弱ながらも観測されるようになり、 $\alpha = 45^\circ$  では明瞭な VSFG 発光が観測された。さらに、 $\alpha$  をさらに大きく ( $>45^\circ$ ) していくとコルテックス領域からの VSFG 発光が次第に弱まり  $\alpha = 90^\circ$  (縦断面) では、僅かしか VSFG 発光が観測されなかった。以上の結果は、 $\alpha$ -ケラチンの分子配向が VSFG 発光強度に大きく影響を与えるという、我々の結論を証明するものである。その一方で、VSFG 発光の絶対強度については、アミド III バンド ( $1650 \text{ cm}^{-1}$ ) に比べるとアミド I バンドは著しく微弱なことも明らかになった。VSFG 発光の強度は、赤外吸収の遷移双極子モーメントとラマン散乱テンソルの行列要素の積からなるが、アミド I バンドにおいては後者の項が極めて小さいために VSFG 発光が微弱になったことが考えられる。

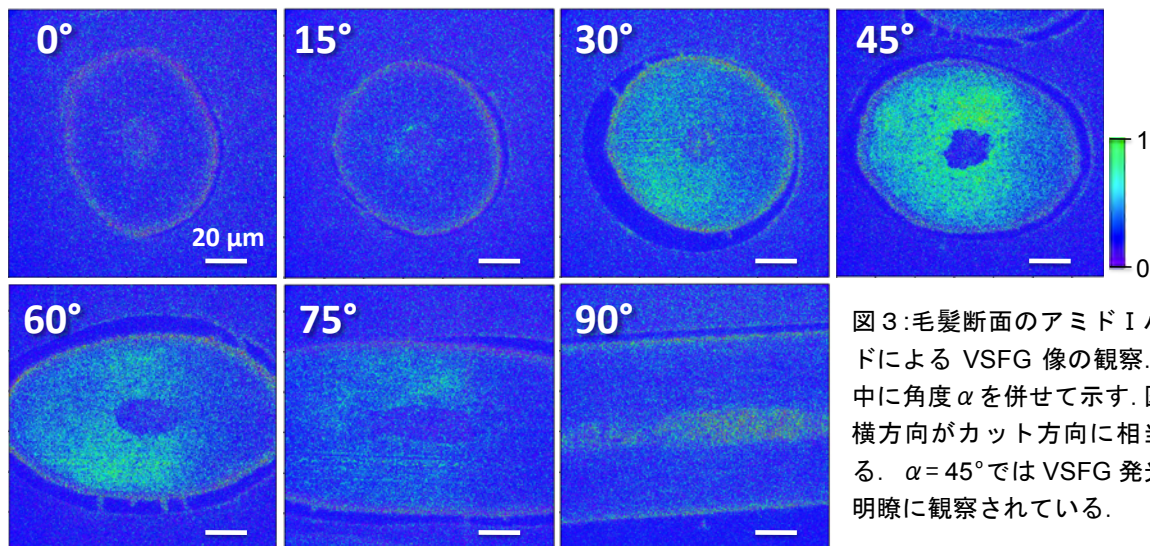


図 3: 毛髪断面のアミド I バンドによる VSFG 像の観察。図中に角度  $\alpha$  を併せて示す。図中横方向がカット方向に相当する。 $\alpha = 45^\circ$  では VSFG 発光が明瞭に観察されている。

$\alpha$ -ケラチンの分子配向と VSFG 発光強度の相関についてより詳細な議論をするために、アミド I バンド観察における VSFG 発光、可視光、赤外光の偏光依存性も測定した。講演では、アミド III バンド観察における角度  $\alpha$  依存性、偏光依存性の結果も含めて報告する。

#### 【参考文献】

- [1] Nagase, S.; Shinozaki, T.; Tsuchiya, M.; Tsujimura, H., *J. Soc. Cosmet. Chem.* **43** (2009) 3.
- [2] 酒井、菊地、藤井 第 6 回分子科学討論会 (2013 東京) 4A19.
- [3] Sakai, M.; Kikuchi, K.; Fujii, M., *Chem. Phys.* **419** (2013) 261.

## 2D12

マルチモード非線形分光イメージングによるラット角膜の *ex vivo* 三次元測定

(東大院・理<sup>1</sup>、筑波大・医<sup>2</sup>、筑波大・数理<sup>3</sup>)

○瀬川尋貴<sup>1</sup>、加治優一<sup>2</sup>、加納英明<sup>3</sup>、小澤岳昌<sup>1</sup>

*Ex vivo* Three-dimensional Analysis of Rat Cornea by Multimodal Nonlinear Optical Imaging

(The Univ. of Tokyo<sup>1</sup>, Univ. of Tsukuba<sup>2</sup>) ○Hiroki Segawa<sup>1</sup>, Yuichi Kaji<sup>2</sup>, Hideaki Kano<sup>2</sup>, Takeaki Ozawa<sup>1</sup>

【序】単一生細胞内の生体分子の挙動や組織・個体の内部構造を知る手段として、近年バイオイメージング技術が広範に用いられている。特に組織や個体の観察を考えた場合には、長波長励起のため浸襲長が深く、非染色条件下での観察が可能である、非線形光学イメージングが非常に有用である。我々は、マルチプレックス・コヒーレント・反ストークス・ラマン散乱(coherent anti-Stokes Raman scattering; CARS)をベースとしたマルチモード非線形分光顕微鏡を開発し、単一生細胞の観察へと応用してきた[1]。本研究では、臨床診断など医学応用を目指した研究への展開としてラット眼球より摘出した角膜の観察を行い、組織観察の可能性と得られる情報について検証した。

【実験】図1(a)に、製作したマルチモード非線形分光イメージング装置の概略を示した。光源には Q スイッチ発振マイクロチップ Nd:YAG レーザーを用いた。基本波 1064 nm の光はまず二分割され、一方はそのまま励起光として、もう一方はフォトニック結晶ファイバへ導入し、白色光に変換した後に近赤外成分(1100 – 1600 nm)のみを取り出し、2 つ目の励起光とした。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集光された後、ダイクロイックミラーにより近赤外・可視域の信号に分割し、別々に分光検出した。

試料には、ラットより摘出した角膜を用いた。麻酔をかけたラットから眼球を摘出した後、顕微鏡下で角膜部分のみを分離し、生理食塩水で満たしたガラスボトムディッシュに浸した。全ての観察は摘出後 24 時間以内に完了している。図1(b)に、角膜の構造の模式図を示した。今回は、角膜上皮層から角膜実質層にかけての領域について、三次元イメージングを行った。

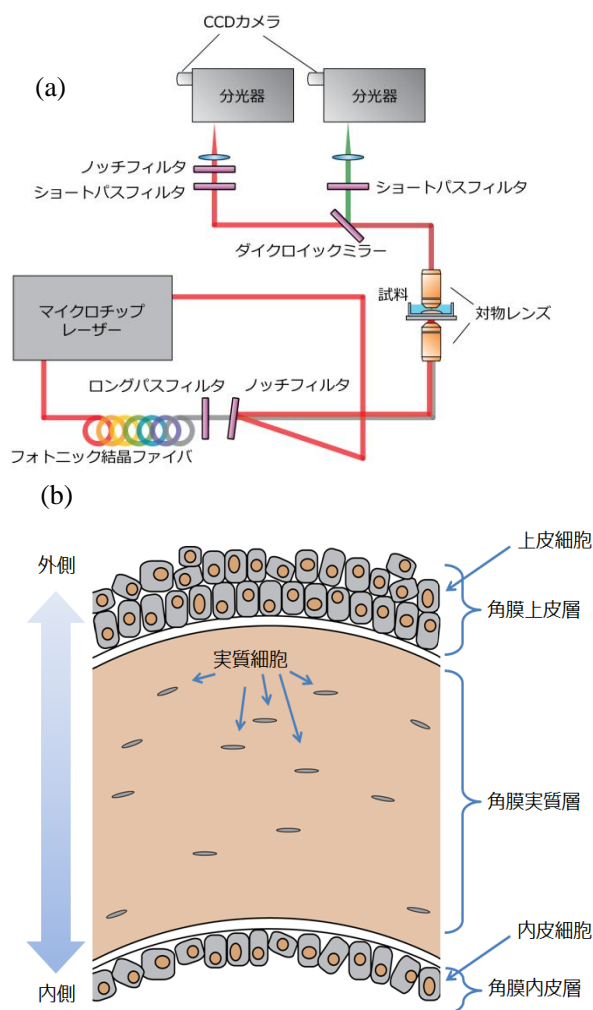


図1(a)開発した顕微鏡の概略図、

(b)角膜の内部構造の模式図

【結果と考察】 深さ方向へのスキャンにより得られたスペクトルの例を図 2(a)に示した。近赤外域にはマルチプレックス CARS 信号が検出され、可視域には第二高調波発生(second harmonic generation; SHG)および三次和周波発生(third-order sum frequency generation; TSFG)の信号が検出された。なお、ここで示した CARS スペクトルは、得られたデータに対し最大エントロピー法を適用することで自発ラマン散乱と同じ情報を持つ  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトルへ変換したものである[1]。スペクトルにみられる各バンドの強度情報を利用することで、奥行き方向に約 200  $\mu\text{m}$  に及ぶイメージの構成に成功した。結果を図 2(b)に示す。TSFG は屈折率・非線形感受率など媒質の光学的性質の不均一な環境下で有意な信号を生じ、SHG は反転対称性のない構造下で強い信号を与える。これと、マルチプレックス CARS イメージが与える分子振動の情報を加味すると、可視化されている構造物の同定が可能である。具体的に、角膜上皮層においては上皮細胞及びその細胞核、上皮細胞の裏打ち構造となる基底膜、角膜実質層においては実質細胞やコラーゲン線維が可視化されていることが分かった。このイメージングでは分子の指紋とも言われるラマンスペクトルを取得できているため、疾病や手術による角膜への影響を分子構造のレベルで議論するといった応用も将来可能になると考えられる。本研究により、非線形分光イメージングを用いて生体組織の内部構造を分子レベルで観察・可視化できることが示された。

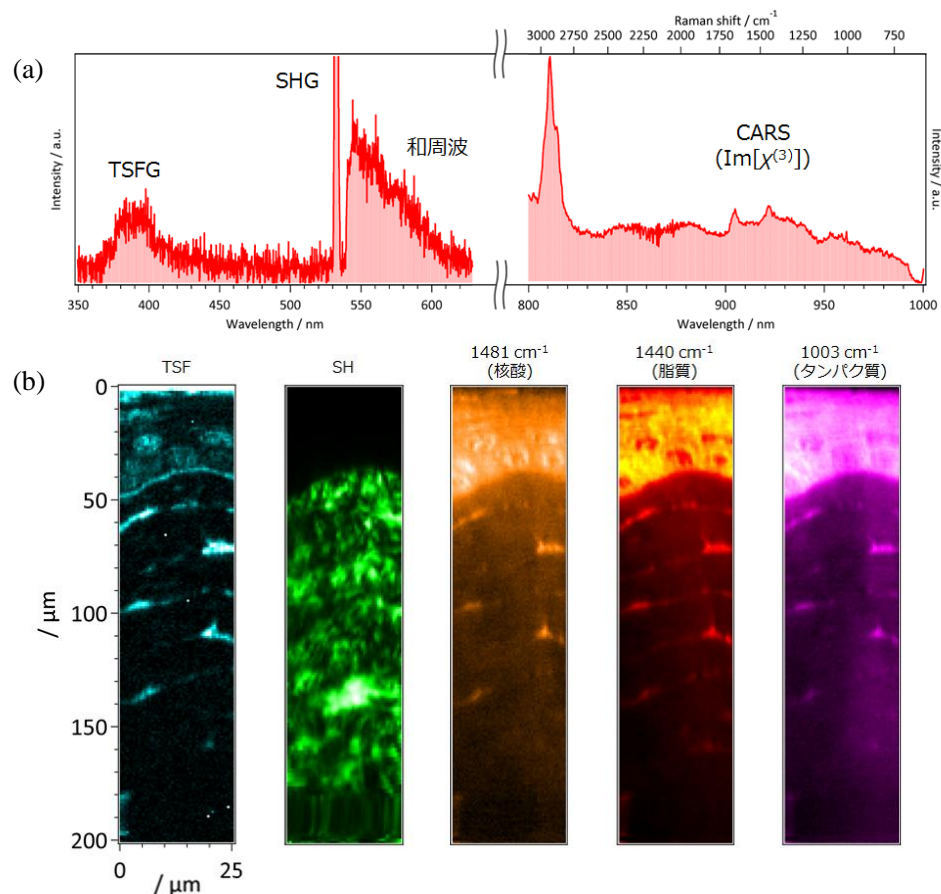


図 2 開発した装置によるラット角膜のマルチモードイメージングの結果。(a)取得されたスペクトルの例。(b)得られたスペクトル中の各バンドの強度により構成した奥行き方向のイメージ。

[1] H. Segawa, M. Okuno, P. Leproux, V. Couderc, H. Kano and H. Hamaguchi, *Opt. Express*, **20**, 9551-9557 (2012)

## Towards spatially resolved magnetic field effect measurements in biological systems

(Univ. of Tokyo, Graduate School of Arts and Sciences)    ◦ Joshua P. Beardmore and  
Jonathan R. Woodward

[Introduction] An important question addressed by spin chemists has been that of whether magnetic fields can exert measurable influences in biology. Indeed the observation of such effects has proved quite controversial due to the difficulty of reproducing observed effects across different laboratories. The most promising target for the observation of robust and significant magnetic field effects in biology has come from the attempt to understand the ability of many species to navigate in the earth's magnetic field. Much progress has been made since 2000, when Ritz *et al.* reinvigorated Shul'ten's original 1978 proposal of the radical pair as a magnetic compass<sup>1</sup>. This work identified the eye as the likely location of the sensor, and a group of newly discovered proteins, called cryptochromes, as the likely source of the radical pair. From one direction, spin chemists have tried to study both model reactions and simplified systems involving cryptochromes and related photolyases *in vitro*<sup>2</sup>. From the other direction, biologists have increasingly improved our understanding of the nature of the magneto-sensing ability and the physical location and characteristics of the sensing apparatus. These two communities have yet to meet in the middle and this research aims at trying to build a bridge between them

The presented research studies the effects of external magnetic fields on biologically relevant, spin correlated radical pairs. A novel application of a continuous-wave laser detection system has yielded improved resolution of the magnetic field effects in a test system based on the interaction between flavin mono-nucleotide (FMN) and hen egg white lysozyme (HEWL). The detection system is being combined with a purpose built microscope that will directly observe the species involved in spin-selective reactions within the sub-cellular structures in which they are found in nature. Although we focus our efforts on the study of flavoproteins in general and cryptochromes in particular, we aim at developing general experimental methods to observe magnetic field effects on reactions within microstructures in a spatially-resolved manner.

The origin of the magnetic effects observed within spin correlated radical pairs lies in the coupling of their electron spins to the nuclear spins and also to external magnetic fields<sup>3</sup>. The radical pairs examined in this work are born from the electron transfer between a lysozyme and a flavin based molecule in an excited state. The radical pair formed remains spin correlated. Application of an external magnetic field alters the spin state of the radical pair and can ultimately affect the products formed upon re-encounter/reaction between the two radicals. A schematic representation of the pathways involved in the FMN-HEWL system are shown in Figure 1.

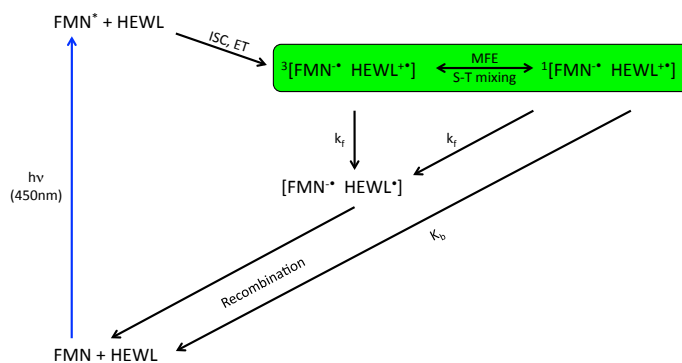


Figure 1: The proposed photochemical reaction scheme of the FMN-HEWL system.

A schematic representation of the pathways involved in the FMN-HEWL system are shown in Figure 1.

[Experiment] In the experiments discussed FMN was excited from the ground state by the output of a Coherent CUBE laser at 449 nm. The output of this laser can either be continuous-wave or modulated at up to 150 MHz by a TTL signal. The output of this laser is beam combined with that of a Coherent Sapphire LP 532. The 532 nm laser light is used to monitor changes in the populations of the radical pair states via absorption spectroscopy. The absorption signal is detected by a Nirvana auto-balanced photoreceiver (Model 2007) which can reduce noise from laser intensity fluctuations by over 50 dB. The output from this detector is then passed into a Stanford Research Systems lock-in amplifier (Model SR830). Modulation of the absorption signal is produced either through modulation of the ‘pump’ laser (449 nm) output or by application of an AC magnetic field (provided by a custom built Helmholtz coil pair). The effects of an applied magnetic field can then be observed.

Initial experiments have been performed utilising aqueous solutions in a standard cuvette. These experiments have enabled the characteristics of the entire system to be studied before the added complexity that arises from the implementation of microscopy. These experiments have also yielded interesting results not previously observed in the FMN-HEWL system. A custom built transmission mode, confocal microscope has also been constructed (see Figure 2) and absorption imaging tests have been performed. The beam combined output of the two lasers can be diverted from the cuvette experiment and launched into a single-mode fiber. This provides a beam with very clean spatial mode, which then passes through a high NA, super apochromat objective lens. The transmitted light is then collected through an identical lens and directed to the Nirvana photoreceiver. A Thorlabs CMOS camera is also utilised for direct imaging (and navigation) of the sample. The sample is mounted to a Physik Instrumente P-545.3R7 3-axis peizo stage. This stage provides 200  $\mu\text{m}$  translation in all three axes with a maximum step resolution of 1 nm.

[Results and Discussion] By using both methods of signal modulation (via ‘pump’ light modulation or through an AC component in the applied magnetic field) we have been able to determine the absolute change in the signal due to an external magnetic field and sensitively detect the changes due to the field. The combined data from these complimentary methods provide the data required to perform detailed simulations to determine many of the reaction kinetics of the scheme outlined in Figure 1.

The two methods of detecting the magnetic field effects in this system also has important implications for imaging within the confocal microscope. Areas of interest can initially be determined by utilising the larger signals obtained using pump beam modulation. These areas can then be scanned at higher resolution and using the more sensitive technique. To date only the initial scanning method has been implemented. The latest results will be discuss in detail during the presentation.

[1] Ritz *et al.*, *Biophys. J.* **2000**, 78, 707-718.; Schulten *et al.*, *Z. Phys. Chem.* **1978**, NF111:1-5.

[2] See recently, Maeda *et al.*, *PNAS* **2012**, 109, 4774-4779.

[3] See Steiner and Ulrich, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 51-147 and references therein.

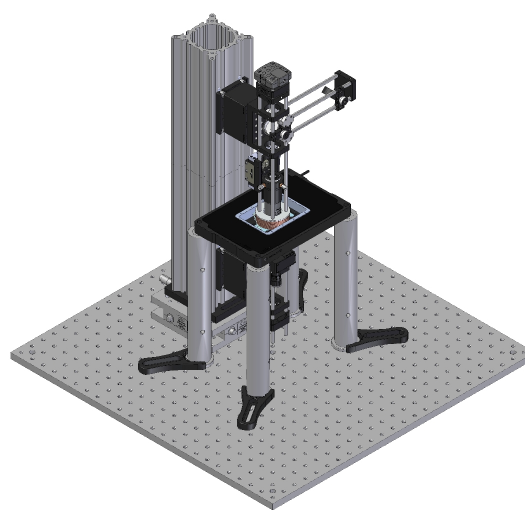


Figure 2: A 3D design drawing of the confocal microscope apparatus.

## 分子システムとしてつくる人工細胞

(神奈川大学) 菅原 正

## Artificial Cell Constructed as a Molecular System

(Kanagawa University) Tadashi Sugawara

**【序】** 階層性のある分子集合体において、要素間の相互作用の協同効果で高次の機能が発揮される場合、このような分子集合体を分子システムと呼ぶ。では、分子システム概念を推し進め、外部刺激により引き起こされるマイクロな階層でのダイナミクスが、上位の階層に伝達されシステム全体の動きを誘発する現象(創発性)を示す分子システムを実現することはできないであろうか？本講演では、両親媒性分子の自己集合体であるベシクルを対象とし、ベシクル自己生産が内部でのDNAの自己複製と連動し、自己複製系の回帰性の獲得、内部の情報分子とベシクルの自己生産能の相関を備えたベシクル型人工細胞を、分子システムとして構築することについて論じる[1]。

**【結果および考察】**

1) **ベシクルの自己生産** 我々はすでに、以下の二つの自己生産系を構築した。i)ベシクルの内水相で、両親媒性分子の疎水部と親水部が脱水縮合反応を起こし、生成した膜分子から娘ベシクルが形成され、ベシクルの外膜をすり抜けて増殖する系(Birthing) [2]、ii) 両末端に親水部が導入された膜分子前駆体が、ベシクル膜に溶存する両親媒性触媒の作用で加水分解して膜分子を生成し、それに伴いベシクルが肥大し分裂する系(Budding)である[3]。特に後者の系は、分裂に伴い減少する触媒を途中で添加すると、分裂が数回継続して起こり、約 100 倍に増幅する[4]。

2) **ベシクル自己生産と内封 DNA の自己複製との連動** ジャイアントベシクル内部で自己複製した情報分子[5]が、いかにして自らを閉じ込めている分子集合体(ベシクル)の自己生産ダイナミクスに関わるかという問題を考える。我々は、あえて膜成分として、ポリアニオン性である DNA と Lipoplex (カチオン性分子とアニオン性高分子の複合体)を形成するカチオン性膜分子を用い、膜電荷をアニオン性のリン脂質で中和したハイブリッドなジャイアントベシクルを用意した。そのベシクル内で PCR 法により DNA を増幅させた後、膜分子前駆体を添加したところ、内部で DNA が増殖したベシクルのみが優先的に肥大して分裂し、増殖した DNA は新たに誕生したベシクル内に分配された。この挙動は、増殖した DNA が、カチオン性膜分子を含むベシクル膜の内表面に局在化することで膜分子生産の活性サイトを形成し、Budding 様式の肥大・分裂を誘発したと解釈される [6]。

3) **回帰性のあるベシクル自己生産系における相の循環** 実現したベシクル型自己複製系のダイナミクスに注目すると、そこには、明瞭に区別できる 4 つの相(捕食相 I、増幅相、捕食相 II、肥大・分裂相)が認められること、各相にはその相を駆動する外部刺激、また場合によっては、その相を終結させる事象が存在し、そのような特性を備えることで、自己複製系の回帰性を獲得している。

**捕食相 I (dNTP の取り込み)**: ベシクル分裂で生成したベシクル(娘ベシクル)は、外部より取り込んだ前駆体 V\* から生産したカチオン性の V を多量に含むため、正の膜電荷を帯びている。ここに、負の膜電荷

をもち、dNTP(DNAの原料)を内封したベシクルを添加し、pHジャンプという外部刺激によりベシクル融合させると、dNTPが娘ベシクルに移送された。膜電荷の中和で捕食相Iは終結する。

**増幅相(DNA複製)**: dNTP充填ベシクルにPCRの温度昇降を施すことで、ベシクル内DNAを増幅する。

この相の終期には、増幅したポリアニオンであるDNAと膜内のカチオン性膜脂質Vや両親媒性触媒Cとの間でLipoplexが形成され、膜脂質生産の活性サイトとなる。dNTPの枯渇で増幅相は終結。

**捕食相II(膜分子生産)**: 増幅相終期にベシクル内膜に膜脂質生産の活性サイトが形成されたベシクルは、V\*の添加により、そのサイト付近で活発な膜脂質生産が行われ、Budding様変形が起こる。

**肥大・分裂相(ベシクル生産)**: さらなる膜生産により、活性サイトを起点としベシクル膜の肥大・分裂が進行する。膜分子前駆体の消費、分裂に伴う膜内部の触媒濃度の減少などで、分裂相は終結する。

重要な点は、それぞれの外部刺激が特定の相にのみ有効なトリガーとして働くことであり、それにより、ベシクルの自己生産ダイナミクスは回帰性を獲得し、自己生産が世代にわたり繰り返される。

**4) DNA鎖長に依存するベシクルの形態変化** 我々の自己複製ベシクルでは、増幅したDNAと両親媒性触媒Cとがリポフレックスを形成することで酵素的な働きをし、ベシクルの肥大・分裂を実現している。したがって、内封する鋳型DNAの長さ(分子あたりのフォスフェートアニオン数)の違いにより、自己複製能に差異が生ずる可能性がある[7]。DNAとカチオン性脂質との相互作用をより顕著にするために、GV膜に分子量約1000(22量体)のポリエチレングリコール(PEG)鎖を担持したリン脂質(0.8mol%)を添加した。そのGVにそれぞれ長さの異なる3種のDNA(374 bp(塩基対), 1164 bp, 3200 bp)を内封し、DNA増幅後に、膜分子前駆体の添加で引き起こされる形態変化を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観測した。

- 1) PEG担持型リン脂質を入れない場合はBudding型変形しか起こらないのに対し、PEG担持型脂質を添加するとBirthing様の変形が観測された。
- 2) BuddingとBirthing変形の分岐点は、膜に接着したDNAがカチオン性の脂質とLipoplexを形成するサイトがベシクル2分子膜の間となるか(Budding変形)、内膜表面となるか(Birthing様変形)にある。
- 3) 等割に近い分裂(自己生産とみなせる)の全形態変化の総数に対する割合は、短いDNA(374 bp)、中程度のDNA(1164 bp) 長いDNA(3200 bp)で、0% : 38% : 9%とDNAの長さにより明確に依存する。特に中程度の長さのDNA(1164 bp)の場合に、自己生産と見なせる形態変化が最も起こりやすい。

以上の実験結果は、DNAの長さ(遺伝子型)と、ベシクル型人工細胞のダイナミクスの頻度や形態変化の様式(表現型)との間に相関があることを示唆しており、幾世代にも跨る自己生産と相俟って、ベシクル型人工細胞の進化を考える上での重要な知見となろう。

#### 【参考論文】

- [1] P. L. Luisi, *The Emergence of Life: From Chemical Origins to Synthetic Biology*. (Cambridge Univ. Press, UK, 2006), J. W. Szostak, D. P. Bartel, and P. L. Luisi, *Nature*. **409**, 387, (2001).
- [2] K. Takakura, T. Toyota, T. Sugawara, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8134–8140 (2003).
- [3] K. Takakura, T. Sugawara, *Langmuir*. **20**, 3832, (2004)
- [4] T. Toyota, K. Takakura, Y. Kageyama, T. Sugawara, et al. *Langmuir*. **24**, 3037, (2008).
- [5] K. Shohda, M. Tamura, Y. Kageyama, K. Suzuki, A. Suyama, T. Sugawara, *Soft Matter*. **7**, 3750, (2011).
- [6] K. Kurihara, M. Tamura, K. Shohda, T. Toyota, K. Suzuki, T. Sugawara, *Nature Chem.* **3**, 3, (2011).
- [7] M. I. Angelova, I. Tsoneva, *Chem. Phys. Lipids*. **101**, 123, (1999).



## イリジウム錯体を用いた生細胞のりん光寿命イメージングと酸素応答

(群馬大院・理工) 吉原 利忠・増田 剛・畠山 泰典・藤倉 大地・飛田 成史

### Phosphorescence Lifetime Imaging and Oxygen Response of Living Cells by Using Iridium Complexes

(Gunma Univ.) Toshitada Yoshihara, Tsuyoshi Masuda, Taisuke Hatakeyama, Daichi Fujikura, and Seiji Tobita

【序】酸素は好気性生物の代謝過程において必須の役割を果たしており、生命活動維持において欠かせない物質である。細胞内において90%以上の酸素は、呼吸鎖における電子伝達系の最終電子受容物質として使用される。一方、組織内における酸素濃度低下は、がん・脳卒中・心筋梗塞などで診られる共通した病態である。このため、細胞、組織などの微小領域内における酸素濃度計測法の開発は、細胞生物学だけでなく臨床医学においても重要である。組織内の酸素濃度計測法として微小電極を用いる方法がある。この方法は、測定中電極周辺の酸素消費を伴うだけでなく、組織に直接電極を挿入するため侵襲的である。また、細胞など $\mu\text{m}$ スケールの微小領域測定は困難である。一方、発光法は高感度および低侵襲的測定が可能な方法として、近年、研究・開発が進められている。発光法を用いた測定では、強度を計測する方法と寿命を計測する方法がある。前者は簡便な測定法であるが、細胞など発光分子が不均一に分布している場合、得られる信号が発光分子の濃度に依存するため定性的な評価に止まる。これに対して寿命法を用いた場合、得られる信号が発光分子の濃度に依存しないため定量的な評価として利用できることが期待できる。本研究では、生細胞内の酸素濃度定量を目指し、細胞内に分布した発光分子からの発光寿命を計測するシステムを作製し、それを用いた寿命計測および寿命イメージングについて報告する。

【結果・考察】図1に開発した顕微寿命システムの概略図を示す。顕微鏡は倒立型蛍光顕微

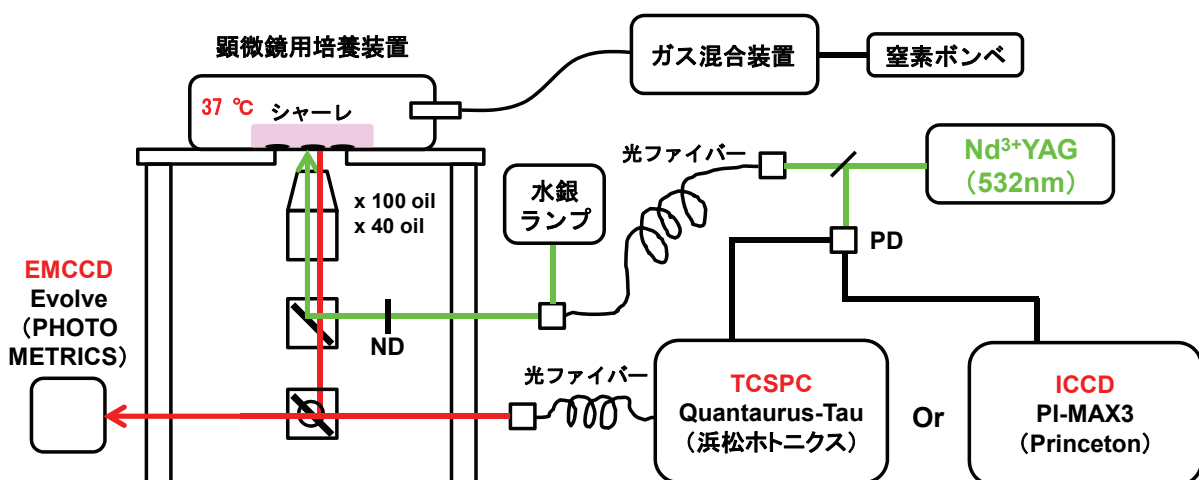


図1 顕微寿命システムの概略図

鏡 (IX-71, OLYMPUS) を用い、細胞を長期間観察するために顕微鏡用培養装置を設置した。培養装置内の酸素濃度はガス混合装置によって任意に設定することができる。寿命計測のための励起光は Nd<sup>3+</sup>YAG レーザー (波長: 532 nm, パルス幅: 1 ns, 繰り返し: 20 kHz) を用いた。細胞からの発光信号は光ファイバーを用いて時間相関単一光子計数法に基づく寿命計に導入した。また、イメージング画像の取得はゲート付き CCD (ICCD) カメラを用いた。

図 2 に発光プローブ分子 (BTP-Mito, BTPDM1) の構造式を示す。BTP-Mito, BTPDM1 は中心金属としてイリジウム原子を有する金属錯体である。BTP-Mito および BTPDM1 は、芳香族配位子としてベンゾチエニルピリジナートを有する。

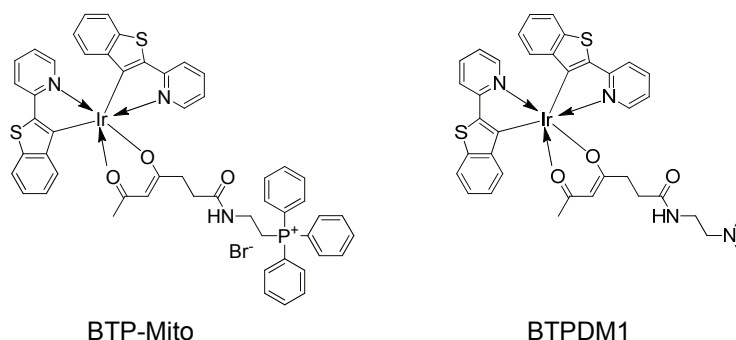


図 2 酸素濃度測定試薬として用いたイリジウム錯体の構造式

また、BTP-Mito ではミトコンドリア集積性を示すトリフェニルホスホニウム基を含むアセチルアセトナート配位子、BTPDM1 ではジメチルアミノ基を含むアセチルアセトナート配位子を補助配位子として有する。BTP-Mito および BTPDM1 の吸収、りん光をテトラヒドロフラン (THF) 中で測定したところ、480 nm 付近の可視光領域に <sup>1</sup>MLCT 遷移に由来する吸収、620 nm の赤色波長領域にりん光を示した。これら錯体の THF 中におけるりん光を空気飽和下および脱気下で測定したところ、脱気下と比較して空気飽和下では顕著な消光が観測された。

培養細胞の培地に BTP-Mito あるいは BTPDM1 を、最終濃度 5 μM になるように添加し 2 時間後、蛍光顕微鏡で観察を行った。その結果、BTP-Mito は主にミトコンドリアに局在し、BTPDM1 はリソソームに局在することがわかった。これより BTP-Mito をプローブ分子として用いた場合、主にミトコンドリア近傍の酸素濃度が計測でき、BTPDM1 ではリソソーム近傍の酸素濃度計測が可能となる。図 3 に培養細胞中における BTP-Mito のりん光減衰曲線を示す。測定はシャーレ内の異なる 4 か所で行った。

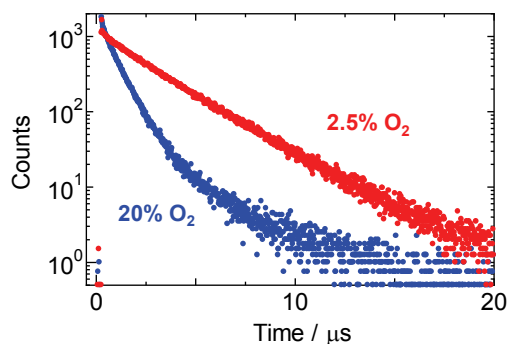


図 3 培養細胞中における BTP-Mito のりん光減衰曲線の酸素濃度依存性

減衰曲線は 2 成分で解析することができ、4 か所の平均寿命は  $1.0 \pm 0.05 \mu\text{s}$  であった。また、培養細胞中におけるプローブ分子の酸素応答を確認するために、培養器の酸素濃度を 2.5% にして同様にりん光減衰曲線の測定を行った。その結果、平均寿命は  $2.6 \pm 0.1 \mu\text{s}$  となり、低酸素細胞においてりん光寿命が約 2.6 倍長くなることが明らかとなった。次に、細胞内のイリジウム錯体からのりん光寿命イメージング画像を取得するために、顕微鏡に ICCD カメラを取り付けて撮影したところ、単一細胞の寿命イメージング画像が取得でき、また、低酸素培養下において寿命が増加することが寿命イメージングからも確認された。

Studies on the change in photoexcitation dynamics of NADH in living cells with  
intracellular environment

(RIES, Hokkaido Univ.) OT. Nakabayashi, Md. Serajul Islam, N. Ohta

**【序】** 生体内に元から存在する蛍光物質(自家蛍光物質)の蛍光寿命を用いた細胞内計測を進めている<sup>1-6</sup>. 細胞は、色素染色を行わなくても自家蛍光分子からの蛍光を示し、自家蛍光を用いることによって、染色による試料への負荷がなく、また染色時間が無いために、手術などにおいて迅速な判断が可能となる. 特に補酵素である還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH, Fig. 1)の蛍光寿命を用いた細胞計測を進めており、細胞内pHを無染色で画像化できることなどを示している<sup>5</sup>. この結果は、NADHの蛍光が周囲の環境によって大きく変化することを用いており、例えば、細胞内の蛍光スペクトルは水溶液中に比べて約10 nm短波長シフトし、細胞内の蛍光寿命(1-2 ns)は水溶液中(約0.3 ns)より数倍長くなる. この細胞内外での蛍光挙動の違いについて、NADHはタンパク質と結合した状態として細胞内では主に存在し、タンパク質との相互作用によって、スペクトルが短波長シフトし、寿命が長くなることが提案されている. しかし、タンパク質との相互作用による蛍光変化の機構は全く不明であり、定量的な考察を行うことができない. 本研究では、NADHの吸収および蛍光の外部電場効果および媒質依存性の測定から、細胞内外でのNADHの蛍光挙動の変化の機構を考察した.

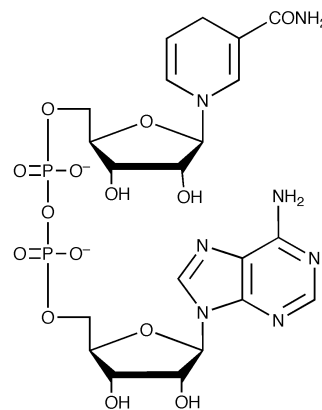


Fig. 1 The structure of NADH.

**【結果】** Fig. 2に酵母内に存在するNADHの時間分解蛍光スペクトルを示す. 時間と共に短波長シフトし、2-5 nsの時間領域のスペクトルは、水溶液中のスペクトルより約10 nm短波長シフトしている. この結果は、細胞内のNADHには、フリーの状態とタンパク質と結合した状態の2つの状態が存在し、蛍光寿命の短い前者からの蛍光が速く減衰し、短波長シフトしたタンパク質と結合した状態からの蛍光が、2-5 nsの遅い時間領域に観測されることで説明できる.

様々な溶媒中でNADHの蛍光スペクトルと蛍光寿命を測定し、蛍光寿命と蛍光位置について、溶媒の極性パラメーターである $E_T(30)$ でプロットした結果をFig. 3aとbにそれぞれ示す. 蛍光位置には重心法で得られた値を用いている. 溶媒の極性が増加( $E_T(30)$ が増加)するにつれて、蛍光寿命は短くなり、極性環境がNADHの無輻射緩和速度を増加させることがわかる. また、蛍光位置は極性の増加によって長波長シフトす

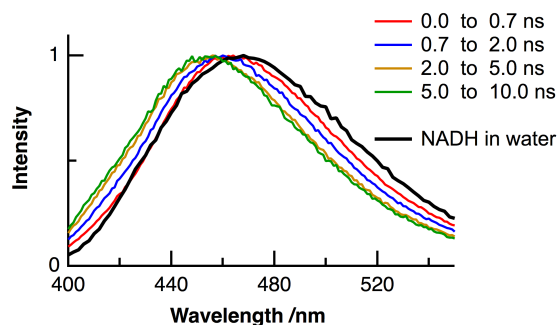
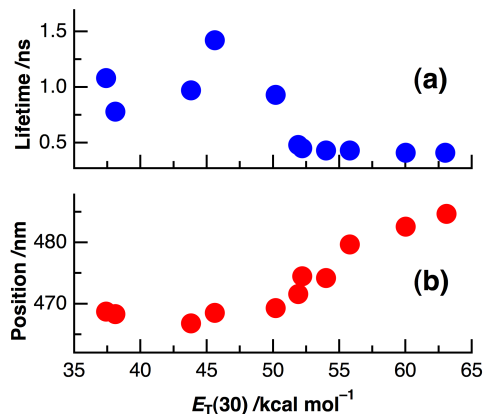


Fig. 2. Normalized time-resolved fluorescence spectra of NADH in yeast cells and static fluorescence spectrum of NADH in aqueous solution (thick-solid line) following excitation at 370 nm.

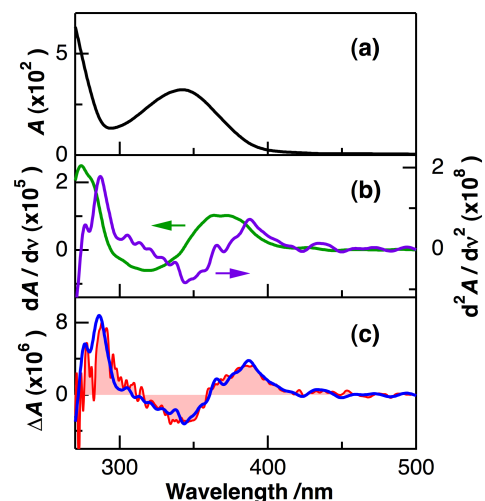
る。この結果は、細胞内でのNADHの蛍光挙動の変化は、NADH周囲の誘電環境によることを示唆している。細胞内でタンパク質と結合したNADHは、周囲をタンパク質のアミノ酸残基で取り囲まれた構造を示す。そのため、NADH周囲の環境は、極性の低い疎水性溶媒と同様の環境になる。このいわゆる溶媒効果のために、タンパク質と相互作用しながらも、スペクトルは短波長シフトし、蛍光寿命は増加したと考えられる。

媒質依存性の結果は、吸収・蛍光スペクトルの外部電場効果の測定からも支持される。Fig. 4にPVA高分子膜中におけるNADHの吸収スペクトルの外部電場による変化成分(電場吸収スペクトル)を示す。電場吸収スペクトルは、吸収スペクトルの0次、1次、そして2次微分の線形結合で表すことができ、1次および2次微分の項から、光励起に伴う分子分極率および双極子モーメントの変化量をそれぞれ求めることができる。電場吸収スペクトルは、吸収スペクトルの2次微分の形を示し、光励起に伴う双極子モーメントの変化( $\sim 4D$ )が支配的であった。励起状態は基底状態と比べてCT性の大きな状態であることがわかる。Fig. 5に、PVA中におけるNADHの蛍光スペクトルの外部電場による変化成分(電場蛍光スペクトル)を示す。電場吸収スペクトルとは異なり、450 nm付近に極大を示す蛍光バンドの強度が、外部電場の印加によって減少した。無輻射緩和速度が外部電場との相互作用によって増加することがわかる。この結果は、蛍光寿命の媒質依存性の結果と一致し、励起状態のCT性によって、静電的な相互作用による蛍光変化が観測されたと考えられる。

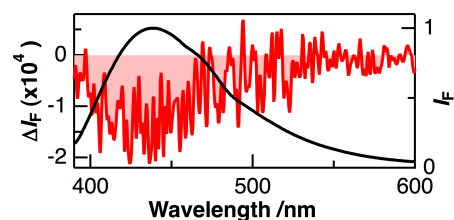
細胞内でのNADHの蛍光変化に、NADH周囲の誘電環境変化が原因の一つになることがわかった。NADHの自家蛍光測定によって、細胞内環境変化に伴うNADHとタンパク質との相互作用の変化・誘電環境の変化を検出することができる。



**Fig. 3.** Plots of fluorescence lifetime (a) and fluorescence position (b) of NADH against  $E_T(30)$ . The first moment was used as fluorescence position.



**Fig. 4.** (a) Absorption spectrum of NADH in PVA, (b) the first (green) and second (purple) derivative spectra of the absorption spectrum, (c) electroabsorption spectrum (shaded red line) and the fitted one (blue). The applied field strength was  $0.7 \text{ MV cm}^{-1}$ .



**Fig. 5.** Fluorescence (black) and electrophotoluminescence (shaded red line) spectra of NADH in PVA with an excitation wavelength of  $360.5 \text{ nm}$ . The applied field strength was  $0.7 \text{ MV cm}^{-1}$ .

1. 中林, 太田 *日本レーザー医学会誌* 30 (2010) 441.
2. 中林, 太田 *光化学* 42 (2011) 52.
3. 中林, 太田 *生物物理* 53 (2013) 166.
4. T. Nakabayahi, et al. *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 15254.
5. S. Ogikubo, et al. *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 10385.
6. Md. S. Islam, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 1952.

## 2D19

クロロフィル *d*をもつ藍藻 *Acaryochloris marina* の光捕集機能の解明  
(神戸大院・理<sup>1</sup>, 神戸大・分子フォト<sup>2</sup>, 京都大院・人環<sup>3</sup>, 東理大・理<sup>4</sup>, JST PRESTO<sup>5</sup>)

○山本 亜美<sup>1</sup>, 横野 牧生<sup>2</sup>, 土屋 徹<sup>3</sup>, 鞆 達也<sup>4,5</sup>, 秋本 誠志<sup>1,2</sup>

### 【序論】

藍藻 *Acaryochloris marina* (*A. marina*) は特徴的な光捕集機能をもつ。多くの藍藻は主要色素にクロロフィル (Chl) *a* を持つが、*A. marina* は Chl *d* (図 1) を持つ[1]。Chl *d* の吸収極大は細胞中で 714 – 718 nm であり、そのため遠赤光が光合成に利用可能である[1]。また、多くの藍藻はチラコイド膜外アンテナ色素タンパク質複合体に半円盤状のフィコビリソーム (PBS) を持つのに対して、*A. marina* はロッド形状のフィコビリタンパク質 (PBP) を持つ。*A. marina* は Chl *d* を主要色素にもつ唯一の藍藻であるにも関わらず、わずか (< 5%) に Chl *a* も持っており、その機能は必ずしも解明されていない。Chl *a* を主要色素にもつ藍藻では、Chl *a* 領域から遅延蛍光 (DF) が観測されることが知られているが、*A. marina* の場合、Chl 領域から DF が観測されるだけでなく、PBP 領域から長寿命蛍光 (> 5 ns) が観測されたという報告もあり[2]、DF が生じるメカニズムは完全には理解されていない。

各色素からの長寿命蛍光及び DF の観測は、*A. marina* における光捕集機能解明において非常に重要である。本研究では、*A. marina* における励起エネルギー移動 (EET) 過程の解明を目的とし、細胞及び単離した PBP の 77 K での時間分解蛍光分光法により測定・解析を行い、光捕集機能に関する考察を行った。

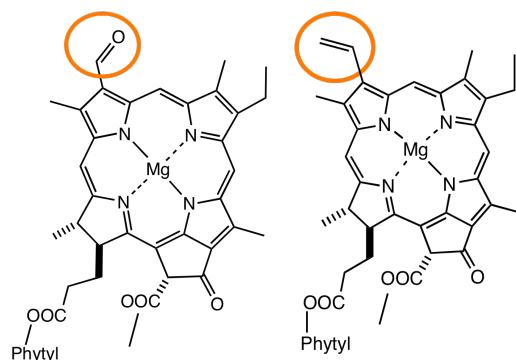


図 1. クロロフィルの分子構造  
(左) Chl *d*, (右) Chl *a*

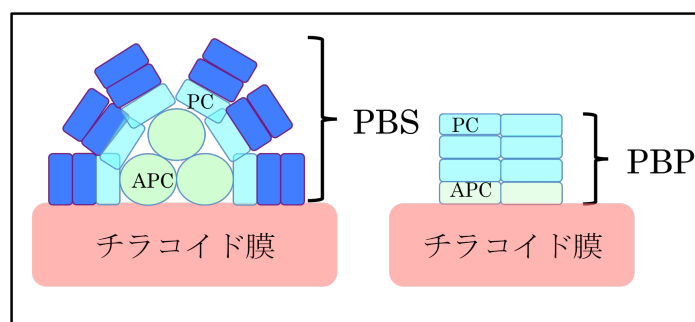


図 2. チラコイド膜外アンテナ色素タンパク質複合体の模式図  
(左) 一般的な藍藻の PBS、(右) *A. marina* の PBP

### 【実験と解析】

藍藻 *Acaryochloris marina* の細胞と単離 PBP の時間分解蛍光スペクトル (TRFS) 及び蛍光減衰曲線を、時間相関単一光子計数法を用いて、77 K、励起波長 400 nm で測定した。TRFS の結果に関しては、全波長の蛍光減衰曲線を共通の時定数でフィットするグローバル解析を行い、Fluorescence-decay associated spectra (FDAS) を得た。

## 【結果と考察】

細胞の FDAS (図 3) は、6 成分で解析を行った (図 3 の赤実線 : 10 倍に拡大、赤破線 : 100 ps 以下の主要ピークをガウス関数でスペクトル分解)。EET の速い過程 (< 100 ps) に関して、40 ps : 高エネルギー-Chl (726 nm) から光化学系 (PS) I の red Chl (低エネルギー-Chl (757 nm))、60 ps : PBP 内 (649 nm)、75 ps : アロフィコシアニン (APC) (670 nm) から PSII の red Chl (732 nm) へのエネルギー移動時定数が得られた。また、PSII Chl 蛍光領域では時定数の増加に伴った主要ピークの長波長シフト、PSI Chl 蛍光領域では少なくとも 2 つの red Chl (753, 761 nm) が観測された。10 ns 以上の寿命をもつ成分では 5 つの波長領域に分解され、各色素で異なる長寿命蛍光をもつ (後述)。細胞内の EET 時定数を Chl *a* を主要色素にもつ他の藍藻 (*Synechocystis* sp. PCC 6803、*Synechococcus* sp. PCC 7002 / 本研究室で測定) と比較して、速いエネルギー移動が起こることが示唆された。

単離 PBP の FDAS (図 4) は、5 成分で解析を行い、50 ps : フィコシアニン (PC) 内・PC から APC、2.02 ns : PC、APC から低エネルギー-APC のエネルギー移動時定数が得られた。細胞と単離 PBP の FDAS を比較すると、PBP 内の EET は単離 PBP よりも細胞においてより速く起こることが考えられる。

各色素における長寿命蛍光及び DF を議論するために、特定の波長を選択し蛍光減衰曲線を測定した。その結果、Chl *a* 領域 : 23 ns、Chl *d* 領域 : 25 ns の時定数で長寿命蛍光が得られた。溶液中における Chl の蛍光寿命は 5 ns 程度であり、長寿命蛍光は PSII 反応中心での電子移動の後、電荷再結合によって励起状態が生じることで観測される (遅延蛍光)。これは、電子移動を仲介する Chl もしくは special pair (Chl 二量体) から観測される。また、PBP に関しては単離体でも PC、APC 領域ともに 10 ns 程度の時定数が得られたことから、PBP の長寿命蛍光は電荷再結合には関与していないと考えられる。

## 【参考文献】

- [1] H. Miyashita, *et al.*, *Nature* **383** (1996) 402.
- [2] Z. Petrášek, *et al.*, *Photochem. Photobiol. Sci.* **4** (2005) 1016 – 1022.

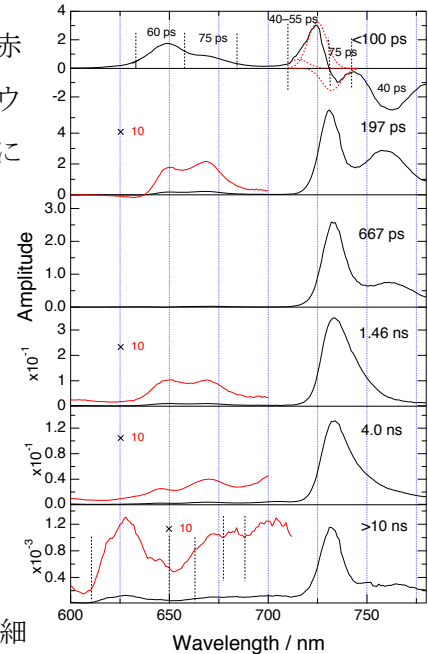


図 3. *A. marina* 細胞の FDAS

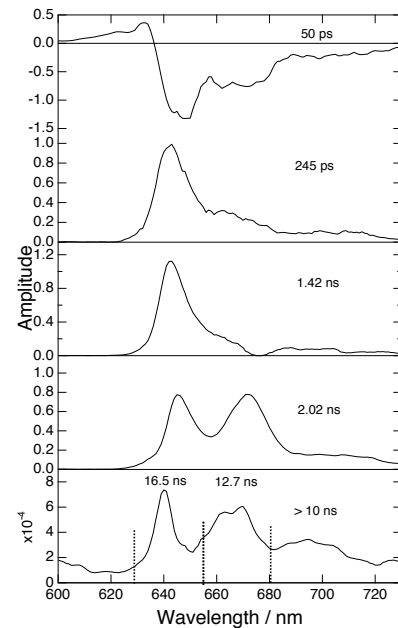


図 4. 単離 PBP の FDAS

## 2D20

### 蛍光寿命と蛍光強度比の同時測定による二次元 FRET 蛍光相関分光

(理研・田原分子分光) ○石井 邦彦、Chao-Han Cheng、田原 太平

Development of two-dimensional FRET-FCS utilizing fluorescence lifetime and fluorescence intensity ratio

(Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN) ○Kunihiko Ishii, Chao-Han Cheng, Tahei Tahara

我々は最近、生体高分子の自発的な構造ダイナミクスを一分子レベルで調べることができる二次元蛍光寿命相関分光法 (2D-FLCS) を開発し、その有用性を示してきた[1-3]。本手法では原理的にサブマイクロ秒オーダーの平衡化過程を可視化することができるが、実際の実験では得られる光子数に限界があるため、長時間のデータ積算が必要であった。本研究ではデータ収集効率を改善する試みとして、FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を利用した実験の場合について、アクセプター由来の蛍光光子の情報を加えた二次元 FRET 蛍光相関分光法を開発した。

【原理】2D-FLCS では、測定対象生体高分子に標識した蛍光プローブの蛍光寿命の変化を利用して、異なる分子構造の間の平衡化過程をある遅延時間での二次元マップとして表す。FRET を用いる場合、ドナーの蛍光寿命を用いてエネルギー移動効率  $E$  を  $E = 1 - \tau/\tau_0$  (1) と表し ( $\tau, \tau_0$  はそれぞれアクセプター有り・無しでの蛍光寿命)、これを Förster の式を通してドナー・アクセプター間距離に対応させることで構造変化を議論する。

一方、FRET 効率はドナー・アクセプターの蛍光強度  $I_D, I_A$  を用いて  $E = I_A / (I_D + I_A)$  (2) と表される。式(1),(2)から分かるように、FRET 効率が上がるとドナー蛍光寿命が短くなるが、より多くの励起エネルギーがアクセプターに移動するため、FRET 効率が低いほど信号収集効率が低下する。以下に述べる二次元 FRET 蛍光相関分光法では、ドナーの蛍光減衰曲線とともにアクセプター蛍光の強度を同時に観測し、ドナーの蛍光寿命 (式(1)) とドナー・アクセプター蛍光強度比 (式(2)) の両面から分子種を同定することで、特に高 FRET 効率種の検出精度の改善を図る。

【実験と解析】時間相関光子計数法 (TCSPC) による蛍光相関分光計[1]の通常の見出し系 (図 1a) に、ダイクロイックミラーを介してアクセプター蛍光を分離・検出する光学系を追加した (図 1b)。これを用いてドナー側の蛍光光子の到着時間  $T$  と励起パルスからの遅延時間  $t$  に加えて、アクセプター側の蛍光光子の到着時間  $T'$  を同時に計測した。ここでアクセプター側の光子を検出した場合はそれを示す値を遅延時間の代わりに  $t'$  に代入した。このようにして得られた  $T, t$  のリスト (図 1c) から  $T_{p''} - T_{p'} = \Delta T$  となる光子の対  $p', p''$  を探し出し、対応する  $t, t'$  の値を参照して二次元ヒストグラムを作成した (図 1d)。得られた二次元マップに対して 2D-FLCS の解析法 [2] に従って最大エントロピー法に基づく逆ラプラス変換と独立成分への分解を行

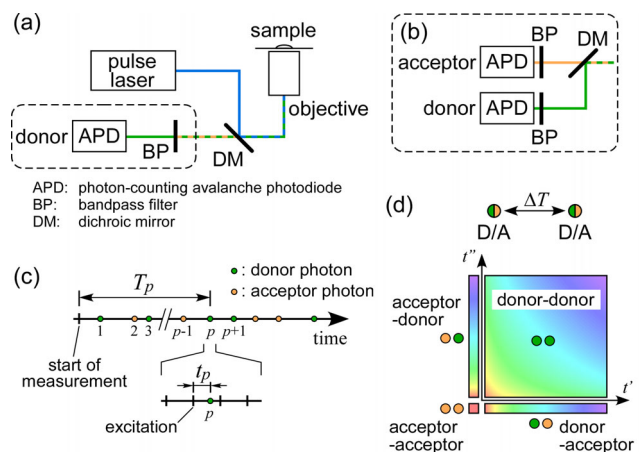


図 1 二次元 FRET 蛍光相関分光法。

い、各成分の蛍光寿命分布とアクセプター蛍光強度を得た。

【結果と考察】図2にFRET標識したヘアピンDNA試料[2]の二次元蛍光遅延時間相関マップ ( $\Delta T = 10\text{-}30 \mu\text{s}$ ) から抽出した 1)第一、第二光子が共にドナー側であった場合、および 2)第一光子がアクセプター側、第二光子がドナー側であった場合の第二光子の蛍光減衰曲線を示す。ヘアピン構造を形成した状態を表す短寿命成分は、ドナー-ドナーの自己相関への寄与は少ないが、アクセプター-ドナーの相互相関に顕著に現れることが分かる。これは短寿命成分が高FRET効率種に対応しており、ドナー側よりもアクセプター側で強く発光することを示している (式(1),(2))。図3は異なる $\Delta T$ での二次元蛍光遅延時間相関マップ ( $\Delta T = 10\text{-}30 \mu\text{s}, 30\text{-}100 \mu\text{s}, 100\text{-}300 \mu\text{s}$ ) を2D-FLCSによりグローバルに解析して得た3つの独立成分の蛍光寿命分布およびアクセプター蛍光強度である。ここでも短寿命種が高いアクセプター蛍光強度を示していることが確認される。(なお、最も蛍光寿命が長い成分はアクセプターを欠いたDNA分子に帰属される[2]。) 3つの成分の自己相関曲線をEnderleinらの方法[4]を応用して計算した結果を図4に示す。アクセプター蛍光強度を含めた場合の結果(a)と、ドナー蛍光のみを用いて計算した結果(b)を比較すると、長寿命成分ではあまり差がないのに対して、短寿命成分では100倍以上の信号雑音比の改善が見られた。これは図2に示したようにアクセプター-ドナーの相互相関に短寿命種の情報が多く含まれているためと解釈できる。本解析で使用したデータは1時間の露光時間で取得したものであり、この方法を利用することで、FRET効率が低い分子種が関与するダイナミクスを比較的短時間で精度良く観測できることが示された。

#### 【参考文献】

1. K. Ishii and T. Tahara, *Chem. Phys. Lett.* **519-520**, 130 (2012).
2. 石井邦彦・田原太平, 第5回分子科学討論会, 1B09 (2011); K. Ishii and T. Tahara, *submitted*.
3. 乙須拓洋・石井邦彦・田原太平, 第5回分子科学討論会, 1B10 (2011); 第6回分子科学討論会, 1B05 (2012).
4. I. Gregor and J. Enderlein, *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**, 13 (2007).

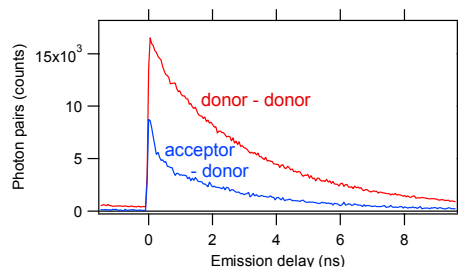


図2 ヘアピンDNAの二次元相関マップから抽出した第二光子(ドナー側)の減衰曲線。

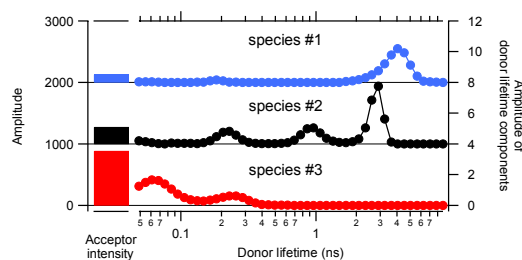


図3 2D-FLCSにより得られた独立成分のドナー蛍光寿命分布とアクセプター強度。

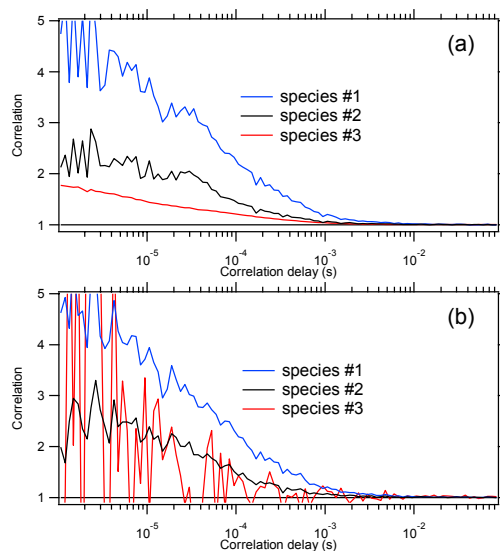


図4 各独立成分の自己相関関数。(a)アクセプター蛍光強度を含めて計算した場合、(b)ドナー蛍光のみで計算した場合。



## 二次元蛍光寿命相関分光のための多焦点共焦点顕微鏡システムの開発

(理研・田原分子分光) ○乙須拓洋, 石井邦彦, 田原太平

### Development of Multi-focus Confocal Microscope System for Two-dimensional Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy

(RIKEN) ○Takuhiro Otsu, Kunihiko Ishii, Tahei Tahara

【序】我々が最近開発を行った二次元蛍光寿命相関分光法 (2D-FLCS) は、蛋白質をはじめとする生体高分子の複雑なダイナミクスを、高い時間分解能で定量的に解析することができる新しい手法である<sup>1,2</sup>。我々はこれまでヘアピン DNA<sup>2</sup> やシトクロム *c*<sup>3</sup> をサンプルとして用い、それらのマイクロ秒構造転移ダイナミクスの解析を行うことにより本手法の有用性について議論を行ってきた。しかしながら、本手法には原理的にきわめて多くの光子データとそのための長時間測定が必要とされ、実際我々が行ったシトクロム *c* の解析においては、データ取得に 6 日間の信号積算を要した。この点を克服すべく本研究では多焦点共焦点顕微鏡の開発を行い、同等の光子データを複数の焦点領域から同時取得することにより、測定時間の短縮を試みた。

【装置】本研究では対物レンズの無限遠補正光学系を利用した多焦点形成を行った。図 1 のように 10  $\mu\text{m}$  離れた二つの点光源から発せられる光は無遠系の対物レンズを通過することで平行光として伝播する。

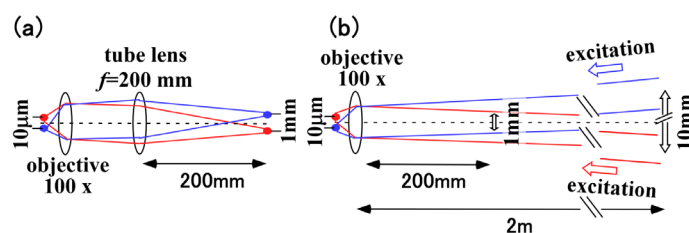


図 1：無限遠補正光学系を利用した多焦点形成の概略図

これら二つの平行光は光軸との角度がわずかに異なっており、これらを適切なフォーカスレンズ (対物レンズによって定められており、図では  $f=200\text{ mm}$ ) で結像させることにより対物レンズの倍率に従った像を得ることができる(a)。一方でフォーカスレンズのない状況では、これら二つの平行光の中心間距離は対物レンズからの距離にともない広がっていき、図 1 に示すような 100 倍対物レンズでは 200 mm 地点で 1 mm、2 m 地点では 10 mm となる。このことは、2 m 地点で 10 mm の中心間距離を有する二つの平行光を対物レンズの瞳に入射することにより、10  $\mu\text{m}$  離れた二つの焦点を形成可能であることを示している(b)。

図 2 には無限遠系を利用した多焦点共焦点顕微鏡の概略図を示している。励起光源には 800 nm、100 fs、80 MHz のパルス光 (TSUNAMI, Spectra Physics) を使用し、フォトニック結晶ファイバー (FemtoWHITE 800, NKT Photonics) を用いて白色光を発生させたのち、バンドパスフィルターで目的の波長の光を取り出し、励起光とした。励起光は 7 つの台形ビームスプリッターを用いて 8 つに分け、そのうちの 7 つを使用した。マルチミラー (M2) 上の各ミラーで反射した 7 つの励起光は 4 m 程度の長いパスを経て対物レンズの瞳に入射した。これにより、マルチミラー上での各励起光の中心間距離とミラーから対物レンズまでの距離に依

存した相対空間配置を有する7つの焦点を試料上に形成することが可能となる(図2b)。各焦点から発せられる蛍光はバンドパスフィルター通過後、集光レンズを用いてファイバーバンドル上に結像した。ファイバーバンドルは7つのファイバーを結像されるイメージに対応するように束ねたものであり、各ファイバーで収集した蛍光はアヴァランシェフォトダイオード(id100, id-Quantique)で検出し、時間相関単一光子計数(TCSPC)ボードで解析した。

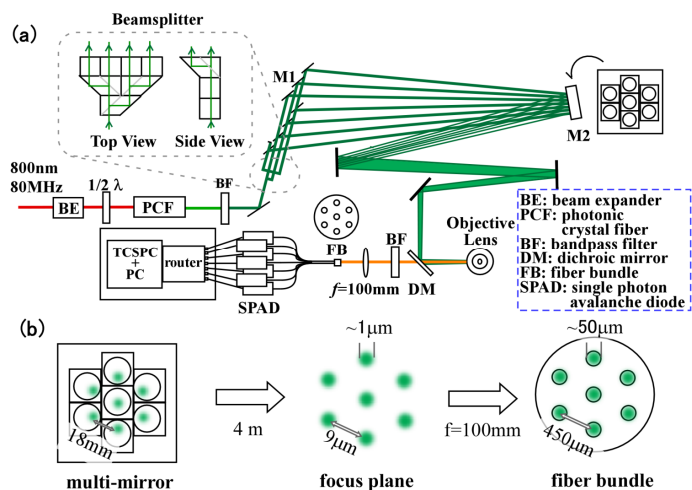


図2 (a) 開発した多焦点共焦点顕微鏡の概略図  
(b) マルチミラー、焦点、ファイバーバンドル端面での励起光、または結像イメージ

【結果と考察】まず始めに本装置を用いて通常の蛍光相関解析を行った。測定にはローダミン 6G のエチレングリコール (EG) 溶液 (2.5 nM) を用いた。通常、単一 SPAD を用いた相関解析にはアフターパルスの影響等が問題となるが、この点については我々が開発した補正法と 2D-FLCS を用いた解析処理により取り除いた<sup>4,5</sup>。解析の結果、

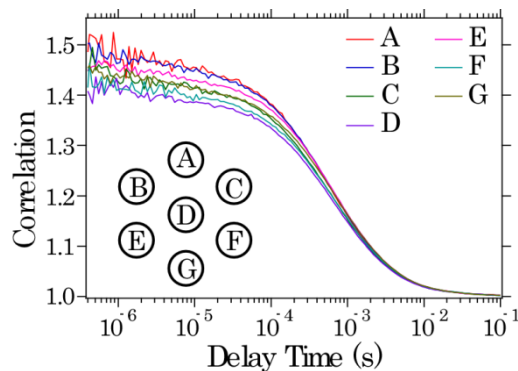


図3：焦点ごとの相関関数

図3に示すように各焦点から同等の相関関数を得ることができた。次に同試料を用いて蛍光寿命測定を行った。各焦点から得られた蛍光減衰カーブには、EGからのラマン散乱、ならびにほかの励起光によるバックグラウンド蛍光(クロストーク)が検出された(図4矢印)。しかしながら、これらの寄与については2D-FLCSにより相関成分の蛍光減衰カーブを抽出することで完全に除去することができた(図4青線)。この結果は、クロストークが完全に無相関であることを示すとともに、本装置を用いて7つの焦点からクロストークフリーの相関成分を抽出可能、すなわち

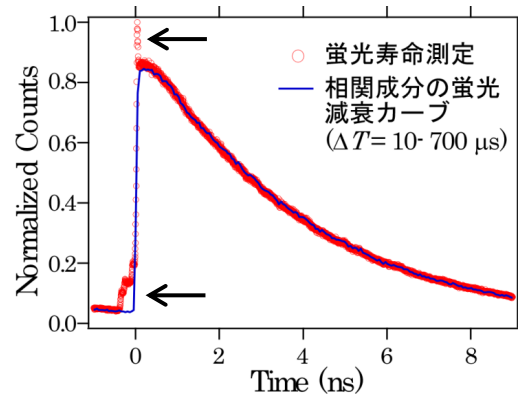


図4：本装置により得られた蛍光減衰カーブと、抽出した相関成分の蛍光減衰カーブ

2D-FLCSによるさらなる解析が可能であることを示す結果となった。これにより、本装置を用いることで2D-FLCSにおける測定時間を単焦点系の1/7に短縮することが可能となった。本討論会では本装置を用いて行った2D-FLCSによる応用例についても議論する。

【参考文献】

1. K. Ishii, and T. Tahara (2012) *Chem. Phys. Lett.*, **519-520**, 130.
2. K. Ishii, and T. Tahara (2013) *submitted*.
3. T. Otsu, K. Ishii, and T. Tahara *manuscript in preparation*.
4. 石井邦彦、田原太平 第6回分子科学討論会 (1P086)
5. T. Otsu, K. Ishii, and T. Tahara (2013) *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 036105.