

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^{1,2}。我々はこれまでヘアピン DNA² やシトクロム *c*³ 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 μm 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。

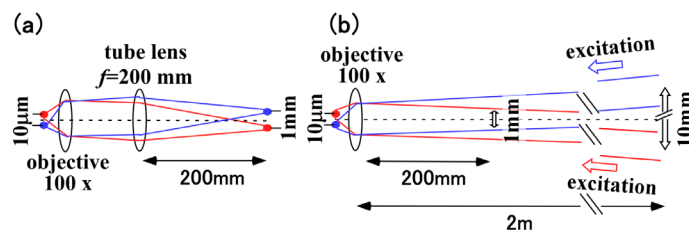


図 1：無限遠補正光学系を利用した多焦点形成の概略図

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 μm 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。

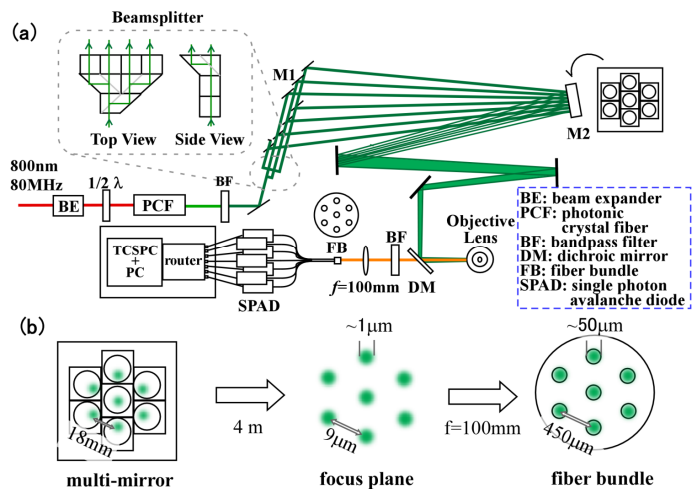


図2 (a) 開発した多焦点共焦点顕微鏡の概略図
(b) マルチミラー、焦点、ファイバーバンドル端面での励起光、または結像イメージ

【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^{4,5}。解析の結果、

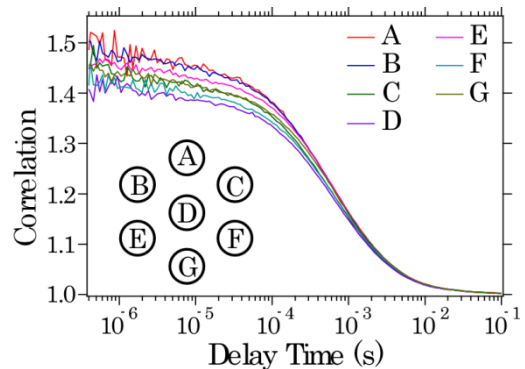


図3：焦点ごとの相関関数

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

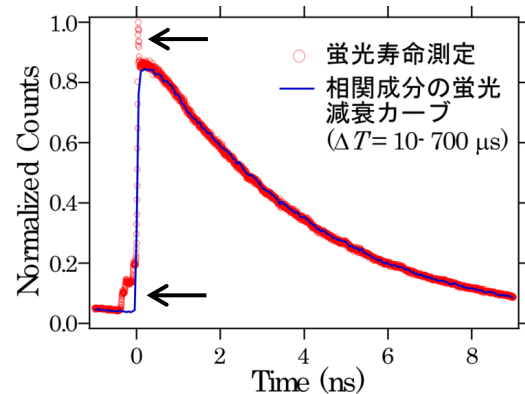


図4：本装置により得られた蛍光減衰カーブと、抽出した相関成分の蛍光減衰カーブ

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.