

## 3P156

### 紫外域の単一分子分光を目指した多光子顕微鏡の開発

(東工大院理工) ○金 昌萬、藤芳 暁、松下 道雄

【序】これまで、可視から近赤外領域の吸収をもつ発色団をプローブとした単一タンパク分光の研究が主であった。紫外域に吸収をもつアミノ酸残基などをプローブとして用いれば単一タンパク分光の応用範囲が格段に広がるはずである。また極低温にタンパク質を冷やすことで均一幅に支配されるスペクトルから室温での幅広いスペクトルに隠れてしまうタンパク質内部の情報を引き出すことができる。そこで、我々は極低温下での紫外域の単一分子分光を目指した多光子顕微鏡の開発を行っている。

極低温における単一分子分光を実現するため、下の2つの条件を満たす対物レンズを設計・製作した。(1) 高いNAを持つ対物レンズを使うためには動作距離の関係から、試料と同時に対物レンズを極低温に冷やさなくてはならない。そのため、対物レンズは極低温下でも動作可能でなければならない。(2) 紫外域での単一分子分光を行うため、幅広い波長領域で使用できる必要がある。幅広い波長領域で用いることができる対物レンズとしては反射型対物レンズが有効である。しかし、市販の反射型対物レンズは2枚の球面鏡とそれを支える棒からなっており、極低温に冷やすと球面鏡の軸がずれてしまい、対物レンズとして機能しなくなる。そこで、我々は色収差がなく、極低温で使用できる反射型対物レンズを作成した。この対物レンズを用いて高感度の多光子顕微鏡を製作した。

【反射型対物レンズ】我々は光線追跡によって反射型対物レンズの設計と評価を行い、その結果に基づき  $NA=0.67$  の対物レンズを作成した。その作成した対物レンズの模式図を図1に示す。

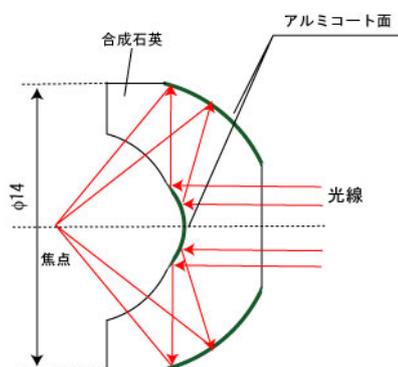


図1 設計作成した反射型対物レンズ

作成したレンズは合成石英で一体設計されていて、極低温において合成石英が5%程度

歪んだとしても像の質には問題ないことを光線追跡により確認した。

作成したレンズの像と市販の反射型対物レンズの像を図 2 に示す。(観測波長 632nm)  
図 2 で示したように市販の対物レンズ (A) は 2 枚の球面鏡を支える棒の影響で複雑な模様が現れるが、我々が作成した対物レンズ (B) は理論計算 (C) 通りにきれいな像が得られた。

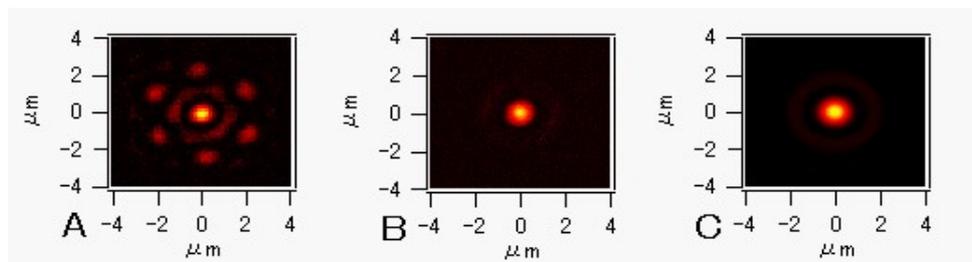


図 2 A：市販のレンズ、B：作成したレンズ、C：理論計算

また、このレンズは反射系を用いるため、色収差は極めて少なく、幅広い波長領域を使う多光子蛍光分光実験に最適である。

【多光子顕微鏡】励起光にはチタンサファイアレーザーを用いた。(波長可変域 705-980 nm, 周波数 90 MHz, 時間幅 100 fs) 色収差を避けるため、顕微鏡の対物レンズ以外の光学系も全て反射光学系を用いた。

極低温の実験の場合、試料と対物レンズをヘリウム温度に冷やすため、試料だけを単独に動かすことが不可能である。そこで、試料を動かさず走査可能にするため、スキャンミラーから対物レンズまでの距離が  $4f$  になるように 2 枚の放物面鏡 (焦点距離:  $f$ ) とスキャンミラーを組み合わせた(図 3)。これによりテレセントリック条件が成り立ち、スキャンミラーの角度を変えることによって対物レンズにおいてのビームの入射角が変わり、励起光を走査することができる。例えば、図 3 のようにスキャンミラーの角度を変え、光線 1 から光線 2 に光線の角度を変えても対物レンズに入射する位置は変わらず、角度のみ変わる。実際にスキャンミラーを動かし、波長 800nm でテストパターンを撮った結果を図 4 に示す。テストパターンの溝の 1 周期は  $3.3 \mu\text{m}$  であり、製作した顕微鏡が正常に働くことを確認した。

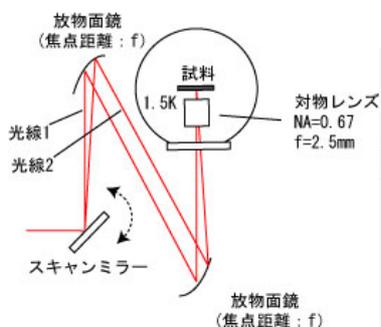


図 3 走査の様子

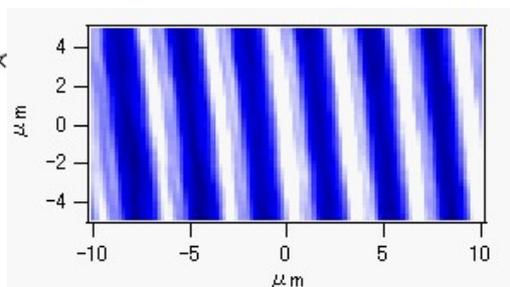


図 4 テストパターンの像

講演では、この対物レンズなど多光子顕微鏡の詳細について報告する。