

蛍光たんぱくの2光子励起スペクトル 励起光源依存性と位相制御による選択的励起

Dependence analysis of two-photon excitation spectra and the selective excitation using phase control in various fluorescent proteins.

田中将大(M1)

M. Tanaka

Abstract

First, we revealed difference of two-photon excitation spectra of fluorescent proteins between the non-chirped excitation light source and the chirped excitation light source using fringe resolved autocorrelation technique. This result implied that two-photon excitation spectra depend on excitation light source. Second, we tried to excite selectively different fluorescent proteins employing phase control scheme.

1 はじめに

蛍光たんぱくの出現とともに生体機能観測における蛍光顕微鏡は非常に強力なツールとしてその重要性が日々増してきており、超短パルスレーザーの発展に伴い非線形効果を利用した2光子励起蛍光顕微鏡が盛んに用いられてきている[1,2]。

蛍光たんぱくを励起する際に指標となる2光子励起スペクトルはWebb氏らによって詳細に測定されている[3]が広帯域光源での計測はなされていない。蛍光顕微鏡に広帯域光源を用いるメリットは光源を複数用いること無く、一度にマルチカラーイメージング像を得られる点にあるが、分光装置と実験装置の色分散の困難を克服せねばならない。広帯域光源を用いた蛍光顕微鏡は研究段階にあるが、広帯域光源の長所を活かしマルチカラー像を得ている研究例も多くあり[4]、広帯域光源の分光上の困難を克服する方法の一つとして、位相制御を用いた選択的励起法も提案されている[5]。

そこで、本研究では励起する指標となる広帯域光源での2光子励起スペクトル明らかにし、位相制御を用いて蛍光たんぱくの選択的励起を行うことによって、広帯域光源の長所を活かした励起方法を提案し、蛍光

顕微鏡の高機能化に向けての基礎技術を向上させる事を目的とする。

2 実験

Fig. 1 に実験装置を示す。光源は Nanolayers 社製 VENTENON|PULSE: ONE, サブ 6 fs パルス Ti:sapphire レーザである。中心波長 850 nm, スペクトル幅 300 nm (FWHM), 繰り返し周波数 75MHz, 平均パワー 250 mW である。光源のスペクトル位相は液晶空間光変調器 (LC-SLM)を用いた 4f 系波形整形器によって位相変調され、自己相関計に入射される。本実験での SLM の波長分解能は 1.516 nm/pix である。自己相関計においては広帯域で透過と反射の分散量が等しく 50%透過のビームスプリッタを用い、分けられた片方のビームを Physik Instrumente 社のピエゾ素子 P-780.20 を用いて 0.1Hz で遅延差を変えていく。このストロークは 80 mm, 閉ループ系での精度は 5nm である。分けられた光パルスの片方は反射型対物レンズによって二光子励起に対応する波長に感度を持つ GaAsP フォトダイオード (G1117, 浜松ホトニクス) に集光され、もう一方は厚さ ~ 300 μm のセルに入れた蛍光 (~ 30 mg/cc)に集光される。蛍光は Semrock 社の蛍光フィルタによって取り出し光電子増倍管 (R7400U-06, 浜松ホトニクス) によって検出される。これらの強度はオシロスコープで測定され、フーリエ変換によってスペクトルの比を算出することで励起スペクトルを計測する。蛍光たんぱくには SeBFP, Sapphire, ECFP, EGFP, Venus, DsRed の 6 種類を用いた。

3 実験結果

3.1 2光子励起スペクトル計測結果

GaAsP ダイオードから得られたシグナルと PMT から得られたシグナルの自己相関波形をフーリエ変換したものは、それぞれ、光源の SH スペクトルと光源に蛍光たんぱくの吸収スペクトルと緩和などの過程が加わった 2 光子蛍光スペクトルに対応する。この 2 つのシグナルの比をとることによって 2 光子励起スペクトルを計測することが出来る。GaAsP ダイオードの波長感度は一定であると仮定した。このようにして得られた各種蛍光たんぱくの 2 光子励起スペクトルを Fig. 2 に示す。また、比較のために 4-f 系波形整形器のフーリエ面においてナイフエッジで励起光の波長帯域を 60 nm に制限して透過波長域の中心波長を掃引しながら計測した 2 光子励起スペクトル Fig. 3 に示す。

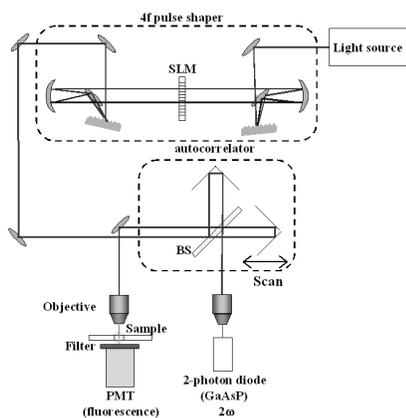


Fig. 1: Experimental setup

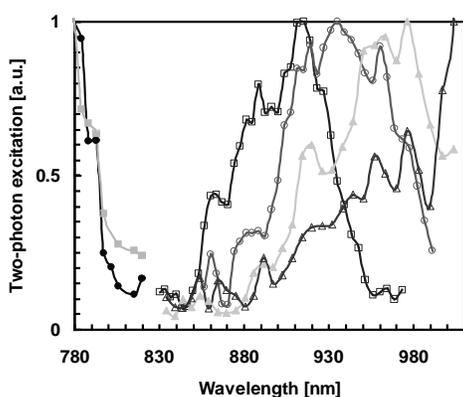


Fig. 2: TPE spectra of various fluorescent proteins. Solid square: Sapphire, solid circle SeBFP, open square: ECFP, open circle: EGFP, solid triangle: Venus, open triangle: DsRed

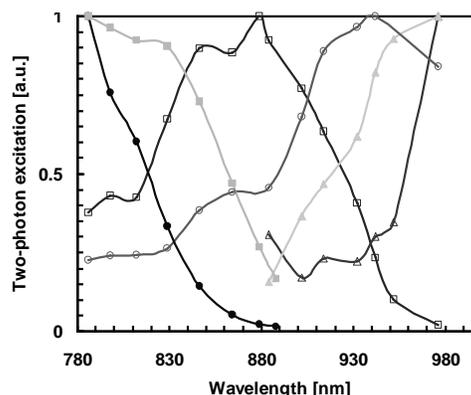


Fig. 3: TPE spectra of various fluorescent proteins measured with scanning center wavelength of 60 nm band-width. Solid square: Sapphire, solid circle SeBFP, open square: ECFP, open circle: EGFP, solid triangle: Venus, open triangle: DsRed

広帯域光源によるフリッジ分解自己相関法により計測した 2 光子励起スペクトルと狭帯域光源による 2 光子励起スペクトル計測結果を比較したところ EGFP と ECFP で大きな違いが見られた。広帯域光源で計測した場合 EGFP は長波長側に、ECFP は短波長側へ吸収のピークが変化している。しかし、励起波長を 60 nm に制限して 2 光子励起スペクトルを計測した場合には 2 光子励起スペクトルの形状はほとんど変わらない [3]。広帯域光源で 2 光子励起スペクトルを計測した場合でも、入射波長帯域の裾の部分に対応する 380 nm, 500 nm 付近に吸収がある YEP, DeRed, Sapphire などの蛍光たんぱくについては狭帯域で計測した場合とほぼ変化がない。2 光子励起過程の波長間の和周波数の組み合わせが多いほど、つまり短波長と長波長 2 つの波長の組み合わせが可能な光源の中心波長近傍の帯域で励起するたんぱくにおいては、励起光源の帯域幅で蛍光たんぱくの実効的な 2 光子励起スペクトルが変化していると考えられる。これは、単純な二準位系でモデル化できる遷移過程を有する物質の場合と異なり、蛍光たんぱくが有する複雑な分子構造であるため、上位準位への励起過程や光誘起脱励起が複数存在し、関与する周波数モードが多いほど多様な励起メカニズムが展開するためではないかと予想できる。よって、広帯域光源で励起する場合には、励起スペクトルを計測する必要があることが明らかになった。

3.2 2次分散印加励起光による実験

次に、励起スペクトルの光源依存性を時間的な周波数掃引の観点から、つまり光源に $\pm 25\text{fs}^2$ 分散を印加してフーリエ変換限界パルスで測定した2光子励起スペクトルとの違いがあるかどうかを調査した。Fig. 4(a), (b)に ECFP (c) (d)に EGFP の場合の実験結果を示す。

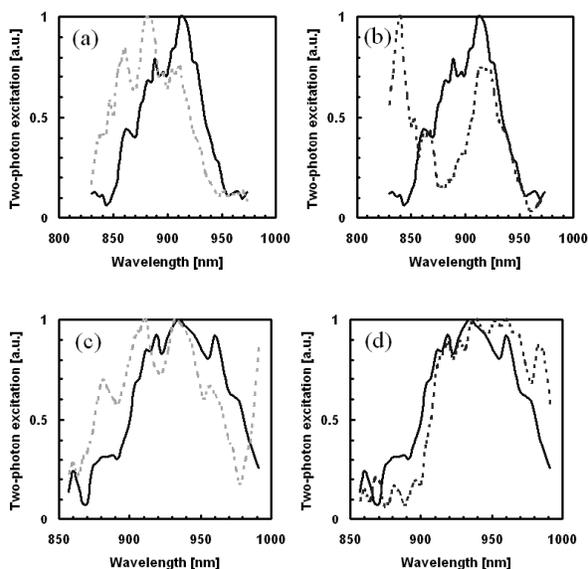


Fig. 4: TPE spectra of ECFP and EGFP with frequency chirping. (a), (b): ECFP, (c), (d): EGFP. dashed line: (a), (c) with chirp rate of -25fs^2 ; solid line: with zero dispersion; dotted line: (b), (d) with chirp rate of 25fs^2 .

Fig. 4, 5 から明らかなように、励起光に2次分散を印加すると ECFP, EGFP 共に2光子励起スペクトルが大きく変化することが分かった。周波数チャープによって光源のSHスペクトルは大きく変化するが、2光子励起過程に周波数モード間の群遅延が関与しなければ2光子励起スペクトルの導出には本質的には影響しないはずであるが、実験結果より周波数モード間の群遅延が2光子励起スペクトルに影響を与えていることが分かった。蛍光たんぱくの種類によって分散と励起スペクトルの変化が異なることから、有機物特有の複雑エネルギー構造が影響していると考えられる。

同時に励起光に2次分散を印加した状態で、蛍光たんぱくから発せられる蛍光強度の変化をプロットした。その結果を Fig. 5 に示す。2光子蛍光は、2次の非線形過程であるので、フーリエ変換限界パルスの時に最も

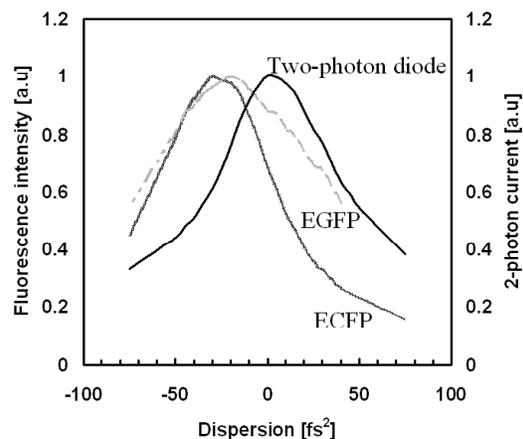


Fig. 5 Fluorescent intensity of ECFP and EGFP. ECFP: meshed line; EGFP: dashed line. Two-photon diode current; solid line.

蛍光強度が強くなるはずであるが、負分散を印加した場合が ECFP, EGFP ともに蛍光強度が強くなった。要因を特定することは困難であるが、誘導放出や蛍光分子の振動波束が蛍光強度に寄与している可能性がある。

3.2 適応制御による選択的励起

適応制御を用いて、FRETで良く用いられる Venus と CFP のペアで選択的励起を実行した。実験結果を Fig. 6 に示す。

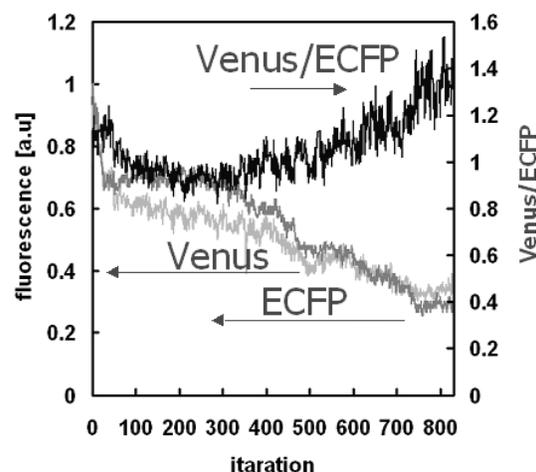


Fig. 6 Selective excitation of ECFP and Venus. Controlled increase ratio Venus/ECFP.

初期パルスをフーリエ変換限界パルスとし、適応制御により、Venus と ECFP の蛍光強度比 1:1 から 1:1.3 に向かわせ、Venus を選択的に励起することができた。しかし、狭帯域光源で得られるようなコントラストは得られなかった。この原因は、光源が広帯域(バンド幅 300 nm)であるので、光源の SH スペクトルと Venus と ECFP の 2 光子励起スペクトルとが重なりあってしまい、位相制御だけでは上手く SH スペクトルと Venus の励起スペクトルだけを重ねる事ができず、選択的に励起することが出来なかったと考えられる。

適応制御により、選択的に励起するのに最適な励起スペクトルと、励起光源の SH スペクトルを探す事が出来れば広帯域光源でも、実験 3.2 の分散と蛍光強度の結果から、狭帯域光源では得られない様な異なるコントラスト向上が望める可能性がある。

4 結論

2 光子励起スペクトルは広帯域光源で計測した場合と狭帯域光源で計測した場合とは異なることが明らかになった。また、励起光に 2 次分散を印加して計測した場合にも 2 光子励起スペクトルは大きく変化した。この原因は主に 2 光子励起過程による励起、さらにはエネルギー移乗、緩和過程による蛍光準位の分布特性にあると思われる。波形整形器にて分散特性を巧く制御すれば、実効的な蛍光たんぱく質の 2 光子励起スペクトルを制御することができ、これまでは励起スペクトルが重なっている場合には困難であったたんぱくにおいても選択的に励起出来る可能性がある。

5 謝辞

本研究は理化学研究所との共同研究で行われました。理化学研究所にて実験設備を利用させていただく機会を得られましたことを、緑川レーザー物理工学研究室 緑川克美先生にお礼申し上げます。理化学研究所におきまして日々の実験指導をしてくださった須田亮先生にもお礼申し上げます。また、実験試料である貴重な蛍光たんぱくを精製していただきました、脳科学総合研究センター 宮脇敦史先生、水野秀明先生にお礼申し上げます。

References

- [1] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb: Science, 248, 73 (1990).
- [2] M.J. Miller, S.H. Wei, I. Parker, and M.D. Cahalan, Science 296, 1869 (2002).
- [3] W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb : Nat. Bio., 21, 1369 (2003).
- [4] K. Isobe, W. Watanabe, S. Matsunaga, T. Higashi, K. Fukui and K. Itoh: J. J. Appl. Phys., 44, 167 (2005).
- [5] Igor Pastirk, Johanna Dela Cruz, Katherine Walowicz, Vadim Lozovoy, and Marcos Dantus: Opt. Express, 11, 1695 (2003).