

フーリエ変換非線形分光法による光変換型蛍光タンパク質の 2光子誘起光変換及び光褪色スペクトル測定

Measurement of two-photon induced photoconversion and photobleaching spectrum of functional fluorescent protein using Fourier transform spectroscopy

橋本博(M2), 春原易典(M1)

H.hashimoto, Y. sunohara

Abstract

We measure the two-photon photoconversion spectrum of photoconversion fluorescent protein called Kaede using Fourier transform nonlinear spectroscopy. The two-photon induced photoconversion spectrum of Kaede at SH wavelengths ranging from 375~438 nm (maximum peak is 397 nm) is obtained for the first time. It is also revealed that the photobleaching spectrum of Kaede varies by incident power of the broadband laser pulse. Therefore, the photobleaching process is not induced by simple two-photon absorption.

1 はじめに

蛍光タンパク質の研究開発が進み、光変換型蛍光タンパク質[1]が発見され注目を集めている。光変換型蛍光タンパク質はある特定の光を入射することで発光波長を変化させる蛍光タンパク質のことである。この蛍光タンパク質を使用することで3次元的に入り組んだ構造をしている神経細胞から単一の神経細胞を明確に可視化したり、光変換領域を回折限界まで限定できるために単一の細胞小器官(ミトコンドリア等)の動態解析が可能となる。一方で、生細胞イメージング分野では2光子励起蛍光顕微鏡が広く使われる時代になっている。2光子励起蛍光は、通常の1光子励起蛍光と違い光子密度の高い領域でしか発光しないために三次元分解能の向上、焦点以外での光褪色の抑制という特徴を持ち、さらに長波長の励起光源を使用できるために1光子励起蛍光顕微鏡に比べて侵達度が高いという長所がある。そのために人間の脳皮質のような厚みを持つ生体組織の観測に広く使われている。このような現状の中で、光変換型蛍光タンパク質の2光子励起特性を調べるのが世界的に求められている。蛍光タンパク質の非線形特性の計測方法は様々なものがあるが、

我々は広帯域な情報をSN比良く測定できることからフーリエ変換非線形分光法を使用した。

2 フーリエ変換非線形分光法の原理

この章では、超広帯域フェムト秒パルスレーザーを使用したフーリエ変換非線形分光法により蛍光タンパク質の2光子励起スペクトルを測定する原理について説明する。Fig. 1は2次高調波発生(SHG)と2光子励起蛍光(TPEF)のエネルギー遷移図である。

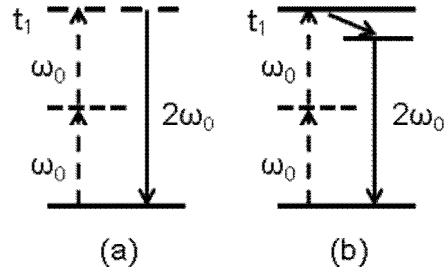


Fig.1 Energy diagrams of (a)SHG and (b)TPEF.

2光子励起蛍光の非線形分極は

$$P(t, \tau) = \int_{-\infty}^{\infty} r(t-t_1)E(t_1, \tau)^2 dt_1 \quad (1)$$

となる。ただし、 τ はパルス間の時間遅延であり、 $r(t)$ は応答関数である。(1)式を、二次の干渉自己相関波形(IAC)の式に代入し、フーリエ変換すると、整流成分、基本波成分、2倍波成分が分かれて出てくる。

(詳細は参考文献[2]) その2倍波成分は、

$$S_{2\omega_0}^2(\Omega) = |R(\Omega)|^2 |A(\Omega - 2\omega_0)|^2 \quad (3)$$

となる。ただし、 Ω は周波数軸、 ω_0 は励起光の中心周波数を表している。これは、2光子励起スペクトルと励起光源のSHスペクトルを掛け合わせたものであるので、SHGのような非共鳴過程を利用して光源のSHスペクトル(以下参照SHスペクトルとする)を取得しておき、

割り算することで2光子励起スペクトルが求まる。

3 実験セットアップ

Fig. 2 に示す実験系で、光変換型蛍光タンパク質 Kaede の2光子誘起光変換スペクトルを測定した。超広帯域フェムト秒レーザー及び589 nmのCW レーザーの入射パワーは緑及び赤Kaedeの光褪色を抑制するために、それぞれ1 mW, 40 μ W とした。自己相関波形を構成する各時間遅延での超広帯域フェムト秒レーザーの照射時間150 msとしたため、ピエゾステージの掃引長は ± 15 μ m に設定し、自己相関のサンプリングポイントは2048とした。サンプルは、できる限り大きな光変換信号を取得するためにグリセリンと90 mg/mlの蛍光タンパク質溶液との混合溶液を使用した。

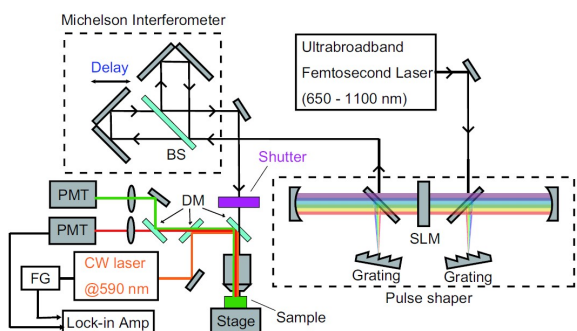


Fig.2 Experimental setup

4 実験結果

4.1 2光子誘起光変換スペクトル測定

ある時間遅延での蛍光の時間推移をFig. 3に示す。最初は超広帯域フェムト秒レーザーがサンプルに入射していないため、緑の蛍光は見られないが、589 nmのCWレーザーは常にサンプルに照射されているので赤の蛍光は観測されている。この赤の蛍光はサンプル作製時に変換されてきた若干量の赤Kaedeであると思われる。その後シャッターを開き、超広帯域フェムト秒レーザーがサンプルに入射されると、緑の蛍光が観測され、赤の蛍光も時間と共に増加していることがわかる。そして再びシャッターを閉じると、緑の蛍光は無くなり赤の蛍光は増加した状態のままとなる。これは生成された赤Kaedeが589 nmのCWレーザーの照射領域に留まっていることによる。その後、次の時間遅延に移る前にステージをXYスキャンすると赤の蛍光は元のベースラインまで落ちていることから、次の遅延時間で589 nmのレーザーの照射領域に存在するサンプルはフレッシュなものになっていると言える。今回の実験で

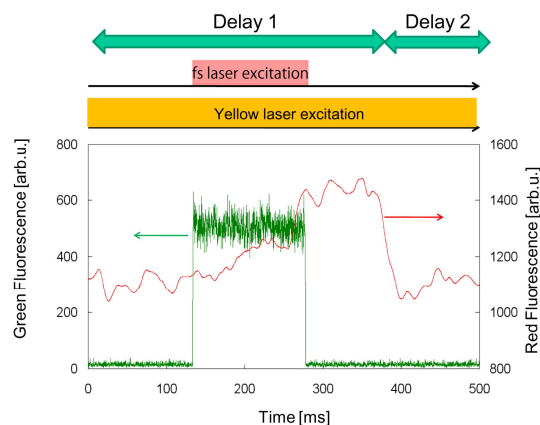


Fig.3 Temporal variations of the TPEF and photoconverted signal within one cycle of the measurement at a certain delay time .

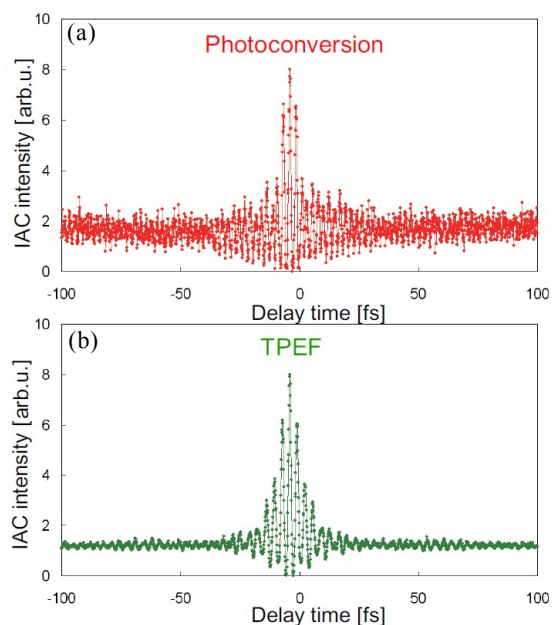


Fig.4 Autocorrelation waveform of (a)two-photon induced photoconversion and (b)TPEF.

は、光変換量として超広帯域フェムト秒レーザーが入射している間に赤の蛍光信号が増加した量を用いた。Fig. 4(a)に示したものが、光変換量の自己相関形、(b)に示しているのが緑カエデの2光子励起蛍光の自己相関波形である。光変換量の自己相関波形は大体1:8を満足しているため、光変換が2光子励起過程で起こっていると良いと思われる。光変換量の自己相関波形は若干SN比が悪いが、これはFig. 3に示したように光変換信号(赤の蛍光信号)が揺らぎを持っているためと考えられる。この揺らぎの原因としては、黄色の照

射領域を赤Kaedeが入り出す際に生じるものと考えられる。同じ条件で多くの自己相関波形を取得し、平均化することでランダムなノイズを軽減させることができる。ただし、1回の自己相関波形を計測するのに30分程度かかってしまうために、今回は自己相関波形を同じ条件で10回測定し、2光子誘起光変換スペクトルを測定した。その結果をFig. 5に載せた。これより、Kaedeは375 ~ 438 nm の範囲で2光子誘起光変換をし、励起極大が397nmであることがわかった。Kaedeを2光子誘起光変換させるためには、一般的なTi:sapphireモード同期レーザーで十分であることが予想される。しかし、実際にはTi:sapphireモード同期レーザーを使ってKaedeを2光子誘起光変換させることは難しい。これは、2光子誘起光変換断面積が非常に小さいためと考えられる。つまり、2光子誘起光変換スペクトルに合った光を吸収した結果、極稀な確率で発色団の構造が変化して赤色で発光(光変換)し、大部分は光褪色を起こしているということが考えられる。しかし、この仮説を実証するにはKaedeの光褪色スペクトルを測定する必要がある。

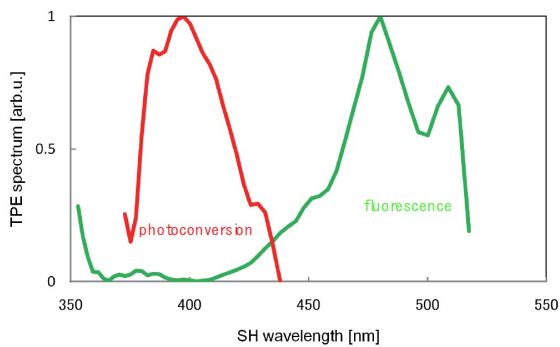


Fig. 5 Two-photon induced photoconversion spectrum and TPE spectrum of Kaede.

4.2 2光子誘起光褪色スペクトル測定

光褪色とは、光エネルギーや熱エネルギーの入射により不可逆的に発光しなくなる現象の総称である。光褪色のメカニズムに関しては、研究段階であり確証を持った理論は提唱されていない。しかし、前述してきたようにKaedeの2光子誘起光変換の実用化を阻んでいるのは、光褪色であることは間違いなさそうである。そこで、我々はフーリエ変換非線形分光法を用いてKaedeの光褪色スペクトルを測定した。

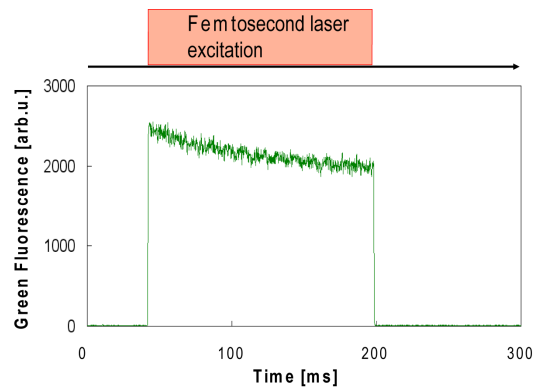


Fig.6 Temporal variation of the TPE at a certain delay time.

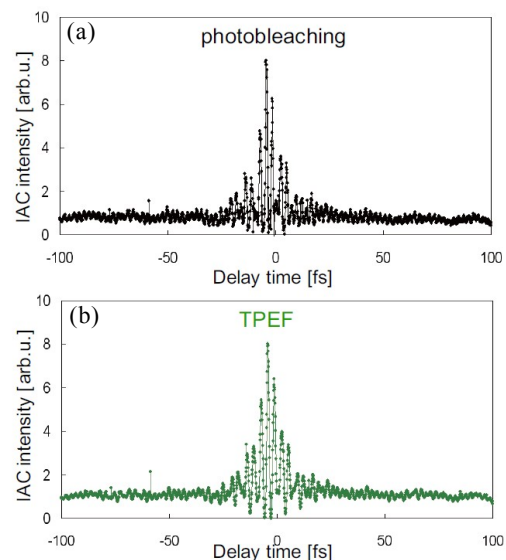


Fig.7 Autocorrelation waveform of (a)two-photon induced photobleaching and (b) TPEF.

Fig. 6 に示している結果は、超広帯域フェムト秒レーザーの入射パワーを4.2mWに設定した際のある遅延時間での蛍光の時間推移である。シャッターが開いた瞬間に蛍光が発生し、照射時間と共に蛍光量が減少していることが見てとれる。今回の実験では、超広帯域フェムト秒レーザーが入射している間に減少する緑の蛍光量を光褪色量として定義した。また、2光子励起蛍光量はシャッターが開いた直後の緑の蛍光量とした。Fig. 7 に光褪色量の自己相関波形と2光子励起蛍光量の自己相関波形を示している。この自己相関波形をフーリエ変換して光褪色スペクトルと2光子励起スペクトルを導出した(Fig. 8)。Fig. 8(a), (b) は超広帯域フェムト秒レーザーの入射パワーを変えて取得した結果

である。

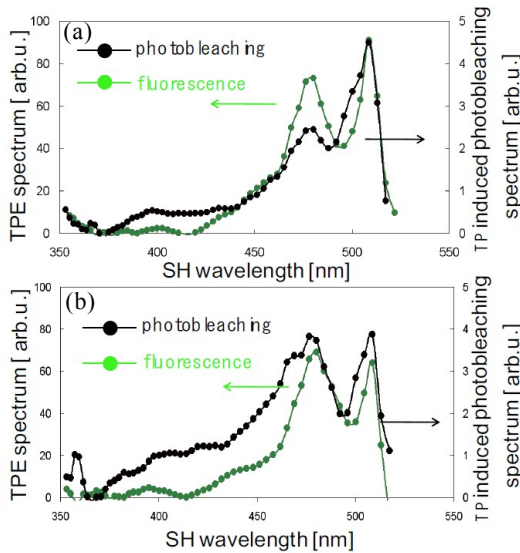


Fig. 8 Two-photon induced photobleaching spectrum and TPE spectrum of Kaede when incident power of excitation laser pulse is (a)2.4mW, (b)4.2mW.

2光子励起スペクトルは入射パワーを上げてても変化していないが、光褪色スペクトルは大体370~450nmの範囲で増加している様子があった。光褪色が2光子励起過程のみであるならば、入射光のパワーを変えても光褪色スペクトルは変化しないはずである。これより、光褪色過程は単純な2光子吸収過程で説明されないということが言える。Fig. 9に今回の実験からわかったことをエネルギー準位図としてまとめた。(a)は2光子誘起光変換過程、(b)は2光子励起蛍光過程、(c)は光褪色過程(推定)である。2光子誘起光変換は2光子励起蛍光の準位より若干高いレベルにあると言える。光褪色過程はあるパルスで1重項状態に励起された分子が寿命の長い3重項状態に遷移し次のパルスにより褪色準位へ遷移するモデルが考えられる。

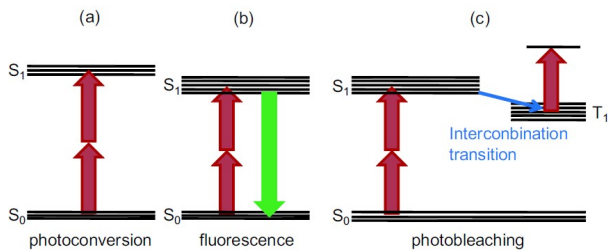


Fig.9 The energy diagram of (a)two-photon photoconversion, (b)two-photon fluorescence, (c) photobleaching

Watanabeらは中心波長760nmのフェムト秒パルスレーザーを使用してKaedeを2光子誘起光変換させて単一ミトコンドリアの動態解析をしているが[3],今回の測定から中心波長800nmのフェムト秒パルスレーザーを使用して、入射平均パワーを十分弱め、蛍光を長時間露光する方法がKaedeを使用した2光子励起実験には有効であると考えられる。実際に使用する上でどの程度の入射パワーが必要かということは絶対値を測定する必要があり次の課題として残っている。

5. まとめ

我々は、フーリエ変換非線形分光法により蛍光タンパク質の2光子励起スペクトルを計測し、以下の結論が得られた。

(a) Kaedeは、SH波長にして375~438nmの範囲にわたり2光子誘起光変換し、励起極大は397nmに存在する。

(b) Kaedeの光褪色過程は、2光子励起スペクトルとほぼ重なる結果を示したが、入射強度を上げると、SH波長にして大体370~450nmの範囲の光褪色に及ぼす寄与が増大する。これより、光褪色過程は単なる2光子励起過程ではなく、複雑な励起過程が存在することを示していると思われる。

謝辞

本研究は理化学研究所緑川レーザー物理工学研究室主任研究員緑川克美博士に実験環境を提供して頂き、副主任研究員須田亮博士の指導を受けて行われました。共同研究者である基礎特別研究員磯部圭佑博士には厚く御礼申し上げます。また、研究試料である蛍光タンパク質の精製や蛍光顕微鏡についてご教授頂いた理化学研究所脳科学研究センター先端技術開発グループ宮脇敦史博士、水野秀昭博士、河野弘幸博士に感謝します。

Reference

- [1] R. Ando, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 12651, 2002.
- [2] K. Isobe, et al., Phys. Rev. A. 77, 063832-1-13, 2008.
- [3] W. Watanabe, et al., Opt. Express 15, 2490, 2007.