

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05312

研究課題名(和文) 光活性型蛍光分子の多段階多光子過程を利用した蛍光顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Fluorescence microscopy using multi-step multi-photon processes of photoactivatable fluorescent molecules

研究代表者

須田 亮 (Suda, Akira)

東京理科大学・理工学部物理学科・教授

研究者番号：80250108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：二光子励起顕微鏡は生体組織の深部観察に適した手段であるが、生体組織による励起光および蛍光の散乱、背景蛍光の発生などが障害となり、観察可能な深さが制限されている。本研究課題では、励起光にパルス幅が10 fs以下の数サイクルパルスを用いて焦点外蛍光を抑制し、到達深度を伸長した。また、蛍光標識となる蛍光分子に光活性型蛍光タンパク質を用いて、逐次的多光子過程として蛍光発光させることにより、背景光の抑制を試みた。試料表面からどの程度の深さまで背景光が生じているかを検証するため、模擬試料としてアガロースゲルに埋め込むための光活性型蛍光タンパク質で染色した蛍光ビーズを新たに作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深部観察の障害となっている主な要因として、生体組織による励起光および蛍光の散乱、背景蛍光の発生などがあげられる。本研究では、焦点外蛍光の発生が励起光のパルス幅に依存することを見出した。マウス脳の深部観察において、120 fsの励起パルスよりも8 fsの励起パルスで観察した方が到達深度が30%ほど大きくなり、これは同じ深さを観察するにあたり励起光の平均パワーを1桁低くしても済むという結果であり、蛍光プローブの褪色を抑制する上でも画期的である。また、光活性型蛍光タンパク質を用いた到達深度の伸長では大幅な改善が得られなかったものの、暗状態試料の作成と使用方法において多くの知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In deep observation using two-photon excitation microscopy, the depth of observation is limited by the background light generated as out-of-focus fluorescence. In this research, few-cycle pulses with a pulse duration shorter than 10 fs were used as the excitation light to suppress out-of-focus fluorescence and extend the depth of observation. In addition, we attempted to suppress the background light by emitting fluorescence as a sequential multiphoton process using a photoactivatable fluorescent protein as a fluorescent label. In order to verify the depth of background light from the sample surface, fluorescent beads stained with the photoactivatable fluorescent protein were newly developed for embedding in agarose gel as a scattering tissue specimen.

研究分野：光工学および光量子科学関連

キーワード：蛍光顕微鏡 光活性型蛍光分子 多光子励起 逐次的過程 深部観察

### 1. 研究開始当初の背景

生体組織の深部観察の手段として二光子励起顕微鏡の普及が進んでいるが、観察可能な到達深度は十分でない。深部観察の障害となっている主な要因として、生体組織による励起光および蛍光の散乱、背景蛍光の発生などがあげられる。散乱が抑制されれば励起光が容易に深部まで届き、十分な強度の蛍光が戻ってきて検出されるので、背景蛍光の問題も同時に解消される。そのため、透明化試薬を用いることや、散乱の影響が少ない赤外光で励起するなどの手段がとられてきたものの、透明化試薬は抜本的解決となるがライブイメージングに使用することが困難であり、赤外励起はこの波長領域で発光する蛍光タンパク質が無いなど、いずれも十分であるとは言えない。

### 2. 研究の目的

二光子励起顕微鏡は生体組織の深部観察に適した手段であるが、二光子顕微鏡においても励起光の散乱や背景光の発生が深部観察の障害となり、観察可能な深さが制限されている。すなわち、対物レンズの焦点で発生する信号光に対し、焦点外で発生する背景蛍光の強度が上回ることが観察可能な到達深度を制限している。本研究課題では、焦点外蛍光が生じる要因を検討し、それらを抑制することで高解像度の深部観察を実証することを目的とする。具体的には、励起光のパルス幅を従来の 100 fs から 10 fs 以下の数サイクルまで短縮し、散乱により本来の光線経路から逸脱した成分が二光子励起に寄与することがないようにする。また、蛍光標識となる蛍光分子に光活性化型蛍光タンパク質を用い、二段階の二光子過程、すなわち逐次四光子過程として蛍光発光させることにより背景光を抑制する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 超短パルス励起光を用いたマウス脳の深部観察

励起光のパルス幅が短くなるに伴い、散乱によりパルスの時間的な重なりが崩れると焦点外蛍光が発生しにくくなると考えられた。そこで、10 fs 以下の数サイクルパルスを光源とした二光子励起顕微鏡を開発し(図1)マウス脳とその模擬試料の深部観察において従来のパルス幅 120 fs の励起光源を用いた場合と比較した。120 fs の励起光源を用いた二光子励起顕微鏡には、OLYMPUS 社製 FVMPE-RS を用いた。マウス脳は表面から 0.5 mm と 1 mm の深さに AAV を注入し、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現させたものである(東京理科大学応用生物科学科佐野良威先生にご提供いただいた)。

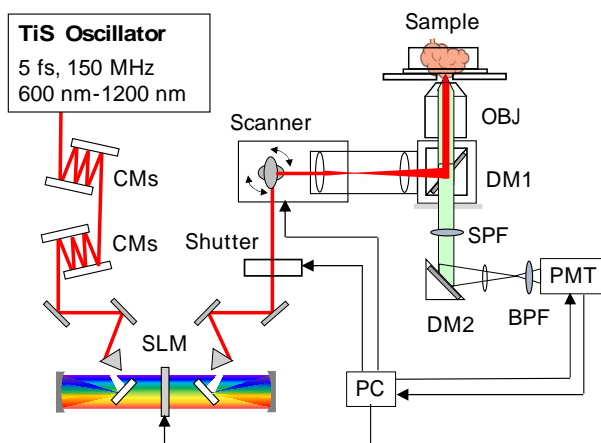


図1 超短パルスレーザーを光源とした二光子励起顕微鏡

#### (2) 光活性化型蛍光タンパク質の分光スペクトル測定

非線形フーリエ変換分光法により光活性化型緑色蛍光タンパク質 Dronpa の分光スペクトルを測定した。装置は図1の二光子励起顕微鏡と基本的に同じであるが、励起光の光路にマイケルソン干渉計を挿入し、2次の自己相関計測を行えるような構成とした。詳細については引用文献( )を参照していただきたい。試料には、蛍光タンパク質溶液をアガロースゲルと混合し、検鏡プレートに封入したものをを用いた。波長 950 nm 近傍の励起光と 800 nm 近傍の誘起光について測定した。

#### (3) 光活性化型蛍光タンパク質を用いた暗状態模擬試料の作成

Dronpa で染色した蛍光ビーズを埋め込んだ各種模擬試料を作成し、深部観察実験に用いた。Dronpa は負のスイッチング特性を持ち、初期状態は明状態であるので、予め励起光を照射することで模擬試料の表面近傍を不活性化させた。また、模擬試料全体に渡って暗状態とするために、蛍光ビーズの段階で励起光を照射して不活性化させてから散乱体と混合して模擬試料を作成した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 超短パルス励起光を用いたマウス脳の深部観察

焦点外蛍光の発生が励起光のパルス幅に依存することを見出した。マウス脳の深部観察において、120 fs の励起パルスに比べて 8 fs の励起パルスで観察した方が到達深度が 30%ほど大きくなった。これは、同じ深さを観察するにあたり励起光の平均パワーを約 1 桁低くしても済むという結果であり(図 2)、蛍光プローブの褪色を抑制する上でも画期的である。

散乱媒質中を伝搬する超短パルス光の挙動をモデル化し、深部観察の SN 比を見積もったところ、概ね上記のパルス幅依存性の実験結果を説明することができた。

##### (2) 光活性型蛍光タンパク質 Dronpa の分光スペクトル測定

非線形フーリエ変換分光法により光活性型蛍光タンパク質 Dronpa の励起スペクトルを測定した(図 3)。波長 950 nm 近傍の励起光と 800 nm 近傍の誘起光を同時に照射しても問題なく、両スペクトル帯域を含む 10 fs 以下の超短パルスが効果的であることを示した。

##### (3) 光活性型蛍光タンパク質を用いた暗状態模擬試料の作成

多光子励起蛍光観察用に Dronpa で染色した蛍光ビーズを埋め込んだ模擬試料を作成した。Dronpa は負のスイッチング特性を示し、初期状態は明状態であるので予め水銀ランプを光源とした 400 nm の励起光を照射することで表面近傍を不活性化した。しかし、その深さは試料の散乱長に相当する表面から 50-100  $\mu\text{m}$  に留まった(図 4)。模擬試料全体に渡って暗状態とするために、蛍光ビーズの段階で励起光を照射して不活性化させてから散乱体と混合して模擬試料を作成した。しかし、前述の励起光の短パルス化を上回る効果は得られなかった。

##### 引用文献

須田亮, 高橋弘史, 戸田圭亮, “フーリエ変換非線形分光法を用いた蛍光タンパク質の光褪色スペクトルの計測,” レーザー研究 43, 213 (2015).

A. Suda, H. Takahashi and K. Toda, “Nonlinear Fourier-transform spectroscopy using ultrabroadband femtosecond pulses for the measurement of photobleaching of fluorescent proteins,” Ultrafast Phenomena XIX, 543 (2015).

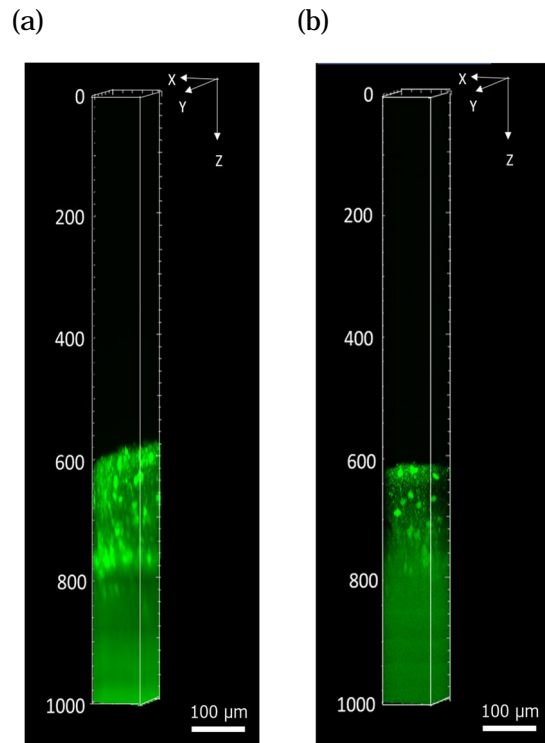


図 2 マウス脳の深部観察画像。励起光は (a) 120 fs、220 mW、(b) 8 fs、22 mW。

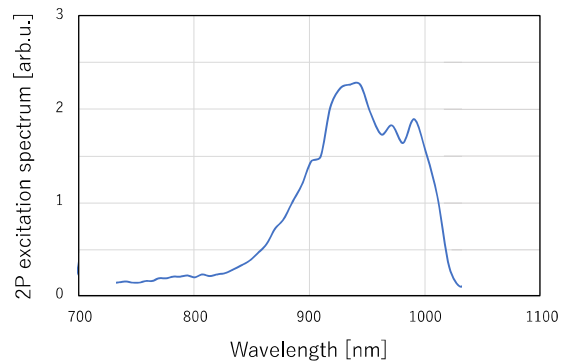


図 3 Dronpa の 2 光子励起スペクトル

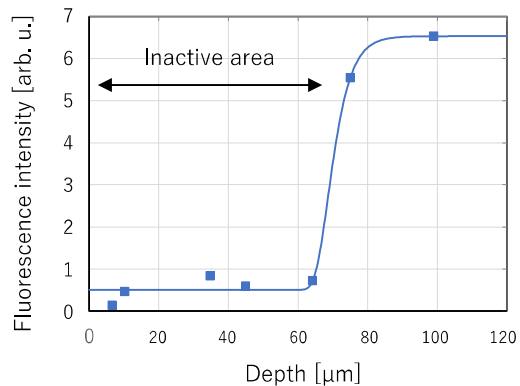


図 4 暗状態模擬試料の蛍光発光特性。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 須田亮	4. 巻 419
2. 論文標題 二光子蛍光観察における光褪色の抑制	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 科学フォーラム	6. 最初と最後の頁 pp. 12-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中村岳史、政池知子、須田亮	4. 巻 419
2. 論文標題 極微小空間での生体分子活性の可視化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 科学フォーラム	6. 最初と最後の頁 pp. 4-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 須田亮	4. 巻 419
2. 論文標題 イメージングフロンティアセンターの取り組み	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 科学フォーラム	6. 最初と最後の頁 pp.2-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野尻摩依、池谷有貴、須田亮
2. 発表標題 蛍光タンパク質の電荷移動ESAと再結合過程の過渡応答解析
3. 学会等名 イメージングフロンティアセンターシンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林拓登, 矢野全一郎, 須田亮
2. 発表標題 時空間集光法を用いた二光子蛍光顕微鏡の構築と観察深度の評価
3. 学会等名 イメージングフロンティアセンターシンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野全一郎, 山村健斗, 須田亮
2. 発表標題 光活性型蛍光タンパク質の二光子変換特性に関する研究
3. 学会等名 イメージングフロンティアセンターシンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池谷有貴, 安藤宏樹, 古閑竣之介, 須田亮
2. 発表標題 数サイクルパルスを用いた二光子励起顕微鏡による生体組織の深部観察
3. 学会等名 イメージングフロンティアセンターシンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須田亮
2. 発表標題 超短光パルスの時空間位相を制御した二光子深部イメージング
3. 学会等名 イメージングフロンティアセンターシンポジウム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------