

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20760037
 研究課題名（和文）
 フェムト秒整形光パルス列を用いた高選択的励起・脱励起イメージング
 研究課題名（英文）
 Highly selective pump-dump imaging with a shaped femtosecond pulse train
 研究代表者
 中村 亮介 (NAKAMURA RYOSUKE)
 （東北大学・大学院理学研究科・助教）
 研究者番号：70379147

研究成果の概要（和文）：

多色のフェムト秒整形光パルス列を励起（脱励起）光源として用いることで、細胞内や細胞外マトリックスに存在する多数の蛍光種から、特定成分の蛍光像を選択的に増幅・抑制する手法開発を行った。二次元空間位相変調器を用いた波形整形システムの構築を行い、任意のパルス列を生成することが可能となった。また、蛍光プローブに対して、適切なパルス列で励起・脱励起を行うことで、電子状態だけでなく、振動励起状態の個性を反映した分子選択が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We have demonstrated that the selective excitation and de-excitation (or re-excitation) method of a fluorescence molecule using femtosecond pulse train with multi colors, which is applicable to highly selective fluorescence imaging of a biological cell and its extra cellular matrix. We constructed the pulse shaping system using two dimensional spatial light modulator and studied suitable pulse trains for the electronic and vibrational character of a target fluorescence molecule.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎 ・ 応用光学・量子光工学

キーワード：超短パルス・波形整形・蛍光イメージング・誘導放出・成分分離

1. 研究開始当初の背景

これまでに、フェムト秒時間分解蛍光分光法によって、光受容蛋白質を含む生体関連物質の光誘起初期過程における、電子励起状態

のコヒーレント振動や振動緩和に関して研究を行ってきた。さらに、2色のフェムトパルス列を用いた励起・脱励起による励起状態波束制御が、光受容蛋白質の光誘起初期ダイ

ナミクスの研究において有効であることを示した。

その一方で、短時間で効率的に蛍光スペクトル、励起スペクトル、蛍光寿命を取得できるイメージング法（多重蛍光分光イメージング）を開発してきた。

本研究内容は、これまでの成果であるフェムト秒パルス列による光誘起初期ダイナミクス追跡と蛍光分光イメージングとを発展的に融合させるものである。

イメージング手法にパルス列を導入することで、選択性の高い手法となる。例えば、空間的选择性という視点からは、励起・脱励起過程を用いた Stimulated Emission Depletion (STED)顕微鏡が、回折限界を超えた超解像顕微鏡としての先駆的な研究例がある。本研究課題は、個々の蛍光種が持つ振電状態とその緩和過程に着目し、パルス整形技術とを組み合わせることで、むしろ蛍光種の成分分離に対する選択性を特徴とする。これは、これまでの研究で得られた振動緩和過程を含む光誘起初期ダイナミクスに関する知見を十分に生かすことで実現される。

2. 研究の目的

細胞内や細胞外マトリックスにおける多数の蛍光種（自家蛍光、蛍光プローブなど）から、特定成分の蛍光像を選択的に増幅・抑制する分光手法を開発する。本手法は、多色のフェムト秒パルス列を用いることで、波長・タイミング選択的に特定成分の励起・脱励起（誘導放出）を行う。さらに、チャープやパルス列などのパルス整形を施すことで、各蛍光種固有の電子基底・励起状態における振動ポテンシャルを利用する。これらの手法を、これまでに独自に開発してきた多重蛍光分光イメージング法（蛍光スペクトル、励起スペクトル、時間分解などの多くの蛍光パラメータを取得することで、未知多成分に対する成分分離能を高める）と融合させることで、極めて成分分離能の高い手法へと発展することが期待される。

3. 研究の方法

広い波長範囲での励起・脱励起イメージングのための光源として、新たに非同軸光パラメトリック増幅器（NOPA）を製作する。さらに、二次元空間位相変調器を用いて、振幅・位相の両方を変調可能な波形整形システムを構築し、任意のパルス列を生成できるようにする。

生成したパルス列を、定常蛍光測定あるいは過渡吸収測定に導入する。さまざまな蛍光プローブの電子基底・励起状態における振動ポテンシャルに着目し、与えたパルス列と、電子励起状態分布数との関係を詳細に検証する。

4. 研究成果

(1) 波形整形システムの構築

再生増幅 Ti:Sapphire レーザー (1kHz, 1mJ, 150 fs) によって、複数の光パラメトリック増幅器 (OPA) を駆動し、さらに非同軸光パラメトリック増幅器 (NOPA) を新規に製作した。シグナル光とアイドラー光の両方のパルス光を使用できる配置を設計し、450~1700nm の広帯域な範囲内での波長可変パルス光 (パルス幅は約 20 フェムト秒) の発生が可能となった。

NOPAにおいて発生させたパルス光を波形整形するために、二次元空間位相変調器を用いた波形整形システムを構築した。二次元面を有効に利用することにより、位相と振幅の両パラメータを変調させることが可能で、任意の整形光パルス列を発生させることができる (図1)。

(2) 電子励起状態の振動ポテンシャルを利用した励起・脱励起

定常蛍光測定および過渡吸収測定によって、さまざまな蛍光プローブの電子基底・励起状態における振動ポテンシャルに着目し、与えたパルス列と、電子励起状態分布数との

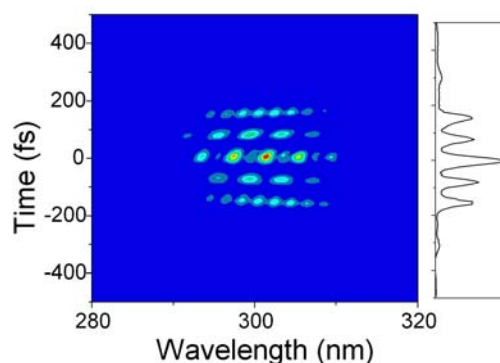


図1 波形整形されたパルス光のSHG-ROGパターン。

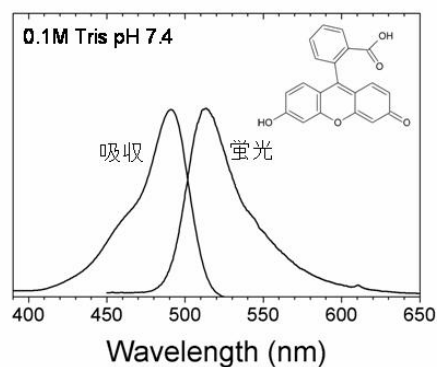


図2 Fluoresceinの定常吸収・蛍光スペクトル。

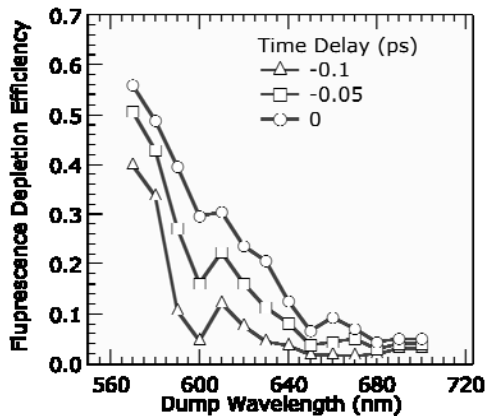


図3 Fluoresceinの定常蛍光スペクトルにおける脱励起効果。脱励起光の波長依存性。

関係を詳細に検証した。

まず、一般的な蛍光プローブ (Fluorescein) を用いて、蛍光スペクトル・強度の脱励起光効果を詳細に検証した。定常蛍光強度 (観測波長 530nm) の脱励起光の有無による減少量を、脱励起光の波長に対してプロットした (図3)。励起直後の振る舞いに着目するため、Time Delay (励起光と脱励起光の時間間隔) として 0ps 付近の結果を表示している。励起直後の脱励起光効果は、波長依存性に構造が観測され、その構造は百フェムト秒程度で消失する。フランクコンドン因子の計算との比較から、この結果は電子励起状態における振動励起状態を反映しており、振動状態の特性を積極的に利用した選択的脱励起が可能であることを示している。

また、電子励起状態における振動励起として、第一励起光で電子励起し、続いて第二励起光でインパルスに振動励起する方法を検討した。図4に Nile Blue 色素の過渡吸収信号に現れたコヒーレント振動のフーリエ変換結果を示す。第一励起光によって電子励

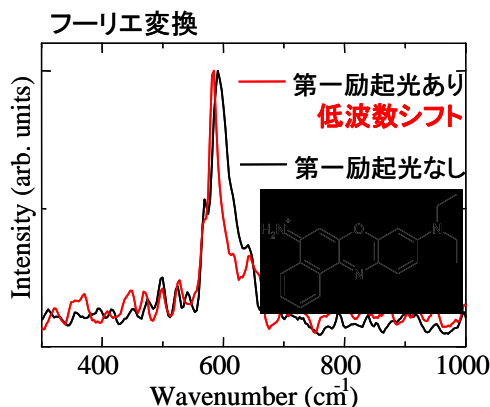


図4 Nile Blue 色素の過渡吸収信号に現れたコヒーレント振動をフーリエ変換した結果。

起した場合、振動周波数が低波数シフトした。Nile Blue の Ring-breathing モードの振動数は電子基底および励起状態で、それぞれ 586cm^{-1} 、 568cm^{-1} であることが知られており、観測した低波数シフトは、第一励起光を入射させることによって、電子励起状態の振動を選択的に励起することに成功したといえる。現在、第二励起光として、振動周波数に同期したパルス列を用いた手法を検討している。

(3) 多重蛍光分光イメージングによるエンバクの感染応答追跡

エンバクは感染シグナル物質であるエリシターによって、ファイトアレキシンと呼ばれる抗菌性二次代謝産物を生成することが知られている。エリシター刺激後のエンバク葉肉細胞の感染応答反応を、自家蛍光をもとに、多重蛍光分光イメージングを行い成分分離を行った。感染応答に重要であると思われる自家蛍光成分 (ファイトアレキシンのひとつである avenanthramide、及び NAD(P)H、クロロフィル) の検出、および各蛍光成分の感染後の時間変化や消長の同時追跡に成功した (図5)。これにより、ファイトアレキシンの細胞内局在や、ファイトアレキシン合成と過敏化反応との関連性について新たな知見が得られた。

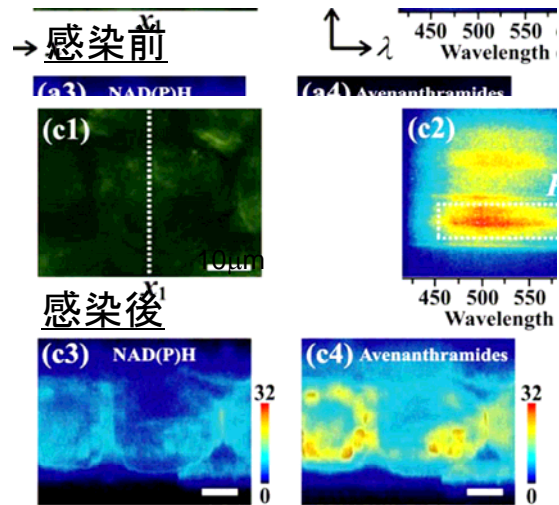


図5 エンバク葉肉細胞の自家蛍光成分の顕微蛍光イメージ

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- (1) Y. Izumi, S. Kajiyama, R. Nakamura, A. Ishihara, A. Okazawa, E. Fukusaki, Y. Kanematsu, A. Kobayashi, "High-resolution spatial and temporal analysis of phytoalexin production in

- oats”, *Planta* 229 (2009) 931-943 査読有.
- (2) Y. Kakitani, T. Miki, Y. Koyama, H. Nagae, R. Nakamura, Y. Kanematsu, “Vibrational relaxation and internal conversion in the overlapped optically allowed 1Bu⁺ and optically-forbidden 1Bu⁻ or 3Ag⁻ vibronic levels: Effects of diabatic mixing as determined by Kerr-gate fluorescence spectroscopy”, *Chem. Phys. Lett.* 477 (2009) 194-201 査読有.
- (3) R. Nakamura, Y. Izumi, S. Kajiyama, A. Kobayashi, Y. Kanematsu, “Line-scanning microscopy for time-gated and spectrally-resolved fluorescence imaging”, *J. Biol. Phys.* 34 (2008) 51-62 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 阿部健太, 中村亮介, 橋本秀樹, 吉澤雅幸, “マルチパルス光励起による励起状態の分子振動制御”, 日本物理学会第65回年次大会, 2010年3月23日, 岡山.
- (2) 市田秀樹, 中村亮介, 濱田格雄, 兼松泰男, “Pump-Dump-蛍光スペクトルにおけるRed-edge dumping[IV]”, 日本物理学会第65回年次大会, 2010年3月23日, 岡山.
- (3) 中村亮介, 中川勝統, 橋本秀樹, 南後守, 吉澤雅幸, “アクセプタ分子に対する光変調法を用いた光合成エネルギー移動解析”, 第20回光物性研究会, 2009年12月11日, 大阪.
- (4) 阿部健太, 中村亮介, 吉澤雅幸, “波形制御された光パルスによる分子振動の制御と観測”, 日本物理学会 2009年年秋季大会, 2009年9月27日, 熊本.
- (5) 中村亮介, 中川勝統, 橋本秀樹, 南後守, 吉澤雅幸, “マルチパルス光励起による光合成アンテナ複合体のエネルギー移動解析”, 日本物理学会 2009年年秋季大会, 2009年9月27日, 熊本.
- (6) 市田秀樹, 中村亮介, 濱田格雄, 兼松泰男, “Pump-Dump-蛍光スペクトルにおけるRed-edge dumping[III]”, 日本物理学会 2009年年秋季大会, 2009年9月27日, 熊本.
- (7) 兼松泰男, 市田秀樹, 濱田格雄, 中村亮介, “Pump-Dump-蛍光スペクトルにおけるRed-edge dumping[II]”, 日本物理学会第64回年次大会, 2009年3月28日, 東京.
- (8) 市田秀樹, 中村亮介, 濱田格雄, 兼松泰男, “Pump-Dump-蛍光スペクトルにおけるRed-edge dumping [I]”, 日本物理学会第64回年次大会, 2009年3月30日, 東

京.

- (9) 市田秀樹, 中村亮介, 濱田格雄, 兼松泰男, “分子認識を目指したPump-Dump-蛍光スペクトルにおけるRed-edge Dumping”, レーザー学会学術講演会第29回年次大会, 2009年1月10日, 徳島.
- (10) 兼松泰男, 市田秀樹, 谷川健人, 濱田格雄, 中村亮介, “整形光パルス列による分子認識”, 日本物理学会 2008年秋季大会, 2008年9月20日, 岩手.

[図書] (計 1 件)

- (1) R. Nakamura and Y. Kanematsu, “Multidimensional Fluorescence Imaging for Non-invasive Tracking of Cell Responses”, *Molecular Nano Dynamics Vol. 2*, Eds., H. Fukumura, M. Irie, Y. Iwasawa, H. Masuhara, and K. Uosaki, Wiley-VCH, (2009) 623-644 (22pages) (Chapt 32).

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 中村 亮介 (NAKAMURA RYOSUKE)

東北大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：70379147

- (2) 研究分担者

()

研究者番号：

- (3) 連携研究者

()

研究者番号：