

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560052

研究課題名(和文) 蛍光タンパク質の光褪色を抑制した2光子励起法の探索

研究課題名(英文) Search for optimum two-photon excitation method with suppressed photobleaching of fluorescent proteins

研究代表者

須田 亮 (SUDA, AKIRA)

東京理科大学・理工学部・教授

研究者番号：80250108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： フーリエ変換非線形分光法により各種蛍光タンパク質の光褪色スペクトルを計測し、励起状態吸収を発端として光褪色が生じることを明らかにした。しかし、その起点としては3重項励起状態以外に寿命の長い未知の暗状態の可能性が示唆された。また、適応制御法により光褪色を起こさずに2光子励起蛍光が最大となるような振幅・位相変調関数を求めたところ、光褪色スペクトルのピークを回避するように振幅制御が行なわれており、分光計測を裏付ける結果が得られた。

研究成果の概要(英文)： Based on the measurement of the photobleaching action spectra of fluorescent proteins with nonlinear Fourier-transform spectroscopy, we found that the photobleaching occurs through excited-state absorption following two-photon excitation from the ground state. An unidentified dark state with a longer lifetime may be the initial state for excited-state absorption besides the triplet excited state. Then, the adaptive control method was applied to modulate the spectral amplitude and phase of excitation pulses maximizing the two-photon excited fluorescence while suppressing the photobleaching. As a result, the spectral amplitude was optimized to avoid the peak of the photobleaching spectra supporting the result of spectroscopic measurements.

研究分野：非線形光学

キーワード： 蛍光タンパク質 非線形分光 光褪色 二光子励起 バイオイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

緑色蛍光タンパク質をはじめとした蛍光タンパク質は、蛍光標識として細胞内の所望の部位に発現させることができることから、今や生命科学の研究に欠かせないツールである。さらに、フェムト秒レーザー技術の進展と相まって登場した2光子蛍光顕微鏡は、生体組織の深い部位の蛍光標識を局所的に励起するため、侵達度の高い蛍光観察が可能であり、細胞機能の可視化やその動的挙動の追跡などに広く利用されている。

しかし、2光子蛍光顕微鏡が開発されて以来、蛍光タンパク質の光褪色は大きな問題であり、誰もが容易に2光子蛍光顕微鏡を扱える状況ではない。これは、蛍光タンパク質の光褪色過程に関する理解が進まないことに起因する。

### 2. 研究の目的

- (1) これまで独自に開発を進めてきたフーリエ変換非線形分光法を用いて、蛍光タンパク質の光褪色スペクトルを計測し、励起状態吸収が蛍光タンパク質に共通な光褪色過程であることを明らかにする。
- (2) 適応制御法により、光褪色を起こさずに2光子励起蛍光が最大となるような2光子励起法を試行錯誤的に見出す。
- (3) 光褪色に繋がる励起状態吸収の起点が寿命の長い三重項状態であることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) 蛍光タンパク質の光褪色スペクトルの計測  
フーリエ変換非線形分光法を用いて、各種蛍光タンパク質の光褪色スペクトルを計測した。試料として用いた蛍光タンパク質は、ECFP、EGFP、EYFP、Venus、Kaede、mCherryである。それぞれの蛍光タンパク質に対して、光褪色を伴った2光子励起蛍光の自己相関信号と、可能な限り光褪色を抑制した2光子励起蛍光の自己相関信号から光褪色スペクトルを導出した。

#### (2) 適応制御法による励起光スペクトルの最適化

適応制御法により、光褪色を抑制した蛍光発光に最適な2光子励起法を見出した。適応制御法とは、位相変調器によって励起光に与える振幅・位相変調を試行錯誤的に変化させて、目的とする事象が最大となるような振幅・位相変調関数を求めていく方法である。ここでは、光褪色を起こさずに2光子励起蛍光が最大となるような励起光スペクトルを探索した。

#### (3) 光褪色の起点となる励起状態の探索

光褪色の初期過程となる励起状態吸収が、寿命の短い(4~5 ns)一重項励起状態を起

点とする場合は、励起光の繰り返し速度が光褪色に影響する。すなわち、ある励起光パルスで励起状態に分布した蛍光分子が基底状態に戻る前に次のパルスによりさらに高い励起状態へ励起され、そこを經由して光褪色に至ると考えられる。現有のフェムト秒レーザー発振器を含め、一般にパルス間の時間間隔は10~12 nsに設定されている。この間隔を半分の5~6 nsに縮めると、一重項励起状態からの吸収は著しく増加するが、寿命の長い(> μs)三重項励起状態からの吸収は殆ど変化しないはずである。そこで、パルス間の間隔を縮めて光褪色量を計測し、光褪色が増加するか否かによってどちらが支配的であるか明らかにした。

### 4. 研究成果

#### (1) 蛍光タンパク質の光褪色スペクトルの計測

フーリエ変換非線形分光法により、光褪色の自己相関波形を取得したところ、背景強度とピーク強度の比が1:16であった。2次の自己相関波形と1次の自己相関波形の積となっていることから、逐次的3光子過程であると考えられた。光褪色の自己相関波形を2光子励起の自己相関波形で割ると1次の自己相関波形となり、これは2光子吸収により生じた励起状態からの1光子吸収を経て褪色することを示唆している。この1次の自己相関波形をフーリエ変換することにより、励起状態吸収(ESA)スペクトルが得られる。図1は緑色蛍光タンパク質(EGFP)の結果である。2光子励起(TPE)スペクトルとともに示すが、750 nm付近にピークを持つ比較的狭いスペクトルである。他の蛍光タンパク質に対しても同様のESAスペクトルが得られた。

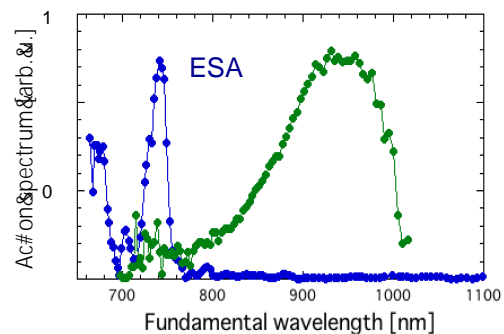


図1 EGFPの2光子励起スペクトル(TPE)と光褪色に至る励起状態吸収(ESA)スペクトル

#### (2) 適応制御法による励起光スペクトルの最適化

位相変調による適応制御が収束しなかったのに対し、振幅変調による適応制御が収束したことから、スペクトル振幅のみに依存した光褪色過程、すなわち1光子励起状態吸収を經由した光褪色が示唆された。また、スペクトル振幅変調による適応制御の結果として励起光スペクトルは750-850 nmに渡る波

長帯域について抑制されるように変化した(図2)。この波長帯域はフーリエ変換非線形分光法を用いて求めた励起状態吸収スペクトル(図1)のピーク位置に対応することから、分光の結果と適応制御の結果は一致したと言える。このように、二光子励起蛍光観測に最適な励起光スペクトルを、その場で試行錯誤的に見出すことが可能となった。

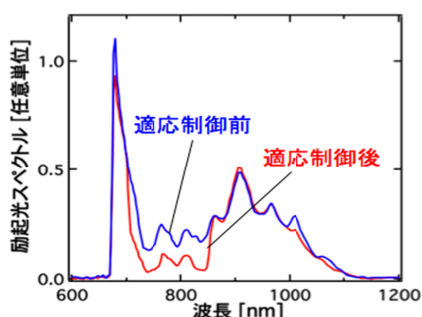


図2 EGFP に対して適応制御により最適化された励起光スペクトル

### (3) 光褪色の起点となる励起状態の探索

励起パルスの時間間隔とエネルギーに対する光褪色量の依存性を調べたところ、光褪色は励起エネルギーの3乗に比例して増加し、励起パルスの時間間隔に対して変化しなかった。これは光褪色が3光子過程であると同時に、1重項状態からの励起状態吸収は支配的でないことを示している。これらの結果より、光褪色は3重項状態を起点とした1光子励起状態吸収を経た過程であると考えられた。

そこで、蛍光強度の減衰特性と回復特性から各準位の寿命を求めたところ、3重項励起状態  $T_1$  以外にさらに寿命の長い未知の暗状態  $D$  を加えた四準位系でなければ説明できないことがわかった。図3にその結果を示す。図1に示す ESA が  $T_1$  を起点とするか、 $D$  を起点とするかは明らかでなく、今後の研究に委ねたい。

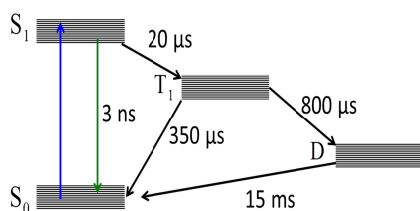


図3 EGFP の各準位の寿命

## 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4件)

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、査読有、vol. 43、2015、pp. 213-216.

[http://www.lsj.or.jp/laser/43/ab43\\_4.pdf](http://www.lsj.or.jp/laser/43/ab43_4.pdf)

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*, 査読有, 2015, pp. 542-546.

DOI 10.1007/978-3-319-13242-6\_133

須田 亮、“位相変調による選択励起マルチカラー2光子蛍光顕微鏡、” *O plus E*, 査読無、vol. 36, 2014, pp. 163-168.

<http://opluse.shop-pro.jp/?pid=66019302>

須田 亮、高橋 弘史、戸田 圭亮、“フェムト秒光パルスの時空間位相を制御した多光子蛍光顕微鏡、” 電気学会研究会光・量子デバイス研究会資料 OQD-13-042、査読無、2013、pp. 5-10.

<https://workshop.iee.or.jp/sbtk/cgi-bin/sbtk-s-howprogram.cgi?workshopid=SBW000027D6>

[学会発表](計16件)

N. Kamiyama, Y. Sunairi, K. Toda, H. Takahashi, and A. Suda, “Observing triplet state dynamics of fluorescent proteins by modulated excitation,” ALPS 2015, Pacifico Yokohama (Yokohama, Japan), April 24, 2015.

神山 直人、砂入 允哉、戸田 圭亮、高橋 弘史、須田 亮、“励起光のスイッチングによる蛍光タンパク質の三重項状態の観測” レーザー学会学術講演会第35回年次大会、東海大学高輪校舎(東京)、2015年1月12日。

大内 拓馬、高橋 弘史、藤田 梨乃、望月 健吾、須田 亮、“時空間集光法を用いた傾斜面の二光子イメージング” レーザー学会学術講演会第35回年次大会、東海大学高輪校舎(東京)、2015年1月12日。

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 2014*, Okinawa Convention Center (Okinawa, Japan), July 8, 2014.

A. Suda, H. Takahashi and K. Toda, “Nonlinear Fourier-transform spectroscopy using ultrabroadband pulses for measurement of photobleaching spectra of

fluorescent proteins,” CLEO 2014, San Jose Convention Center (San Jose, USA), June 11, 2014.

戸田 圭亮, 高橋 弘史, 須田 亮, “励起光のスペクトル位相・振幅変調による蛍光タンパク質の蛍光褪色制御,” レーザー学会学術講演会第 34 回年次大会, 北九州国際会議場(小倉), 2014 年 1 月 22 日.

須田 亮, 高橋 弘史, 戸田 圭亮, “フェムト秒光パルスの時空間位相を制御した多光子蛍光顕微鏡,” 電気学会研究会光・量子デバイス研究会「ナノメディシンに向けた光・量子ビーム応用」, 防衛医科大学校(所沢), 2013 年 11 月 22 日.

戸田 圭亮, 高橋 弘史, 須田 亮, “蛍光タンパク質の蛍光褪色抑制に向けたフェムト秒レーザーのスペクトル位相・振幅制御,” 第 74 回応用物理学会学術講演会, 同志社大学(京田辺), 2013 年 9 月 19 日

K. Toda, H. Takahashi, and A. Suda, “Dependence of the photobleaching of fluorescent proteins on the repetition rate of femtosecond light pulses,” CLEO-PR 2013, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan), July 3, 2013.

H. Takahashi, K. Toda, K. Mochizuki, K. Isobe, F. Kannari, H. Kawano, H. Mizuno, A. Miyawaki, K. Midorikawa, and A. Suda, “Measurement of the photobleaching spectrum based on the excited-state absorption of fluorescent proteins with Fourier-transform nonlinear spectroscopy,” ALPS 2013, Pacifico Yokohama (Yokohama, Japan), April 25, 2013.

高橋 弘史, 戸田 圭亮, 須田 亮, “二光子 FRET 計測に向けた蛍光タンパク質の光褪色抑制,” 第 60 回応用物理学会春季学術講演会, 神奈川工科大学(厚木), 2013 年 3 月 27 日.

戸田 圭亮, 高橋 弘史, 須田 亮, “適応制御による蛍光タンパク質の褪色抑制に対するスペクトル振幅の最適化,” 第 60 回応用物理学会春季学術講演会, 神奈川工科大学(厚木), 2013 年 3 月 27 日.

戸田 圭亮, 高橋 弘史, 須田 亮, “励起光のスペクトル振幅変調による蛍光タンパク質の光褪色速度制御,” レーザー学会学術講演会第 33 回年次大会, 姫路商工会議所(姫路), 2013 年 1 月 30 日.

高橋 弘史, 戸田 圭亮, 須田 亮, “蛍光タンパク質の光褪色スペクトル計測にお

ける蛍光回復の影響” レーザー学会学術講演会第 33 回年次大会, 姫路商工会議所(姫路), 2013 年 1 月 30 日.

高橋 弘史, 戸田 圭亮, 望月 恭平, 須田 亮, “蛍光タンパク質の励起状態吸収に基づく光褪色スペクトルの測定,” 第 73 回応用物理学会学術講演会, 愛媛大学(松山), 2012 年 9 月 14 日.

戸田 圭亮, 高橋 弘史, 須田 亮, “適応制御による蛍光タンパク質の蛍光褪色に対するスペクトル位相・振幅の最適化,” 第 73 回応用物理学会学術講演会, 愛媛大学(松山), 2012 年 9 月 14 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称: 多光子励起スペクトル及び多光子吸収スペクトル計測装置  
発明者: 須田 亮、緑川 克美、宮脇 敦史、神成 文彦  
権利者: 理化学研究所  
種類: 特許  
番号: 5051744号  
出願年月日: 平成20年7月7日  
取得年月日: 平成24年8月3日  
国内外の別: 国内

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

須田 亮 (SUDA Akira)  
東京理科大学・理工学部 教授  
研究者番号: 80250108

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

高橋 弘史 (TAKAHASHI Hiroshi)  
東京理科大学・理工学部 助教  
研究者番号: 70572709