

令和元年6月17日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K04983

研究課題名(和文) 深部超解像観察に向けた多光子過程を制御した蛍光顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of fluorescence microscopy with control for multiphoton processes in super-resolution deep imaging

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体組織深部で高い分解能の蛍光観察を実現するため、蛍光標識となる蛍光タンパク質を意図的に褪色させる二光子励起法を確立し、時空間集光法による広視野二光子観察と合わせて、超解像蛍光イメージング技術を開発することを目的とした。eGFPの光褪色速度を測定したところ、二光子励起では励起状態吸収(EA)誘起光の有無による変化量が小さく、超解像観察に必要な程度まで光褪色を制御することは困難であった。この原因を明らかにするため全反射照明型顕微鏡を構築し1分子観察を行った結果、EAに続く電荷移動が可逆的な光褪色を引き起こしていること、不可逆的な光褪色はそれに連動して生じる副次的な現象であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光タンパク質の褪色現象はその原因が明らかでないなか、超解像観察などにおいて積極的に利用されている。本研究では、深部観察に有効な二光子蛍光観察において褪色を利用することを試みたが、超解像観察に必要な程度まで褪色を制御することは困難であった。励起状態吸収に続く電荷移動が可逆的な光褪色を引き起こしていること、不可逆的な光褪色はそれに連動して生じる副次的な現象であることが原因と考えられ、これは褪色現象のさらなる解明と応用の展開に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：In order to realize high-resolution fluorescence imaging in the deep part of living tissue, we have developed a two-photon excitation technique for intentionally bleaching fluorescent proteins, as well as wide-field two-photon imaging with spatio-temporal focusing. As a result of measuring the photobleaching rate of eGFP, the amount of change with or without the Excited-State Absorption (ESA)-induced light was small, which suggested that it was difficult to control the photobleaching to the extent necessary for two-photon excited super-resolution imaging. In order to clarify this cause, we constructed a total internal reflection fluorescence microscope to observe the fluorescent proteins at single molecule level. It was found that charge-transfer ESA causes reversible blinking, and irreversible photobleaching is a secondary phenomenon which is related to the blinking.

研究分野：光工学および光量子科学関連

キーワード：深部観察 多光子過程 蛍光顕微鏡 超解像イメージング

1. 研究開始当初の背景

微小物体の形態を回折限界を超える解像度で観察する超解像技術は、分子生物学や生命科学に革命的な進歩をもたらす画期的な技術である。初の実証以来、実用化に向けて急速に技術開発が進展し、現在では製品として広く普及している。しかしながら、超解像観察が可能な領域は試料の表面近傍に限られ、深部まで三次元的に観察することは困難である。例えば、PALM、STORMなどの光活性化局在法では、観察できる深さは表面からわずかに数 100 nm に過ぎない。このように、これまで達成されている超解像観察は試料表面の二次元観察と言っても過言ではない。これを三次元観察に拡張するには、試料の深部を観察する二光子励起法に超解像技術を組み込む必要がある。

2. 研究の目的

光活性化局在法などの超解像観察では発光の ON/OFF の切り替えが鍵となる技術であり、ON から OFF への切り替えは蛍光タンパク質の光褪色を利用するのが常である。蛍光タンパク質の光褪色は寿命の長い三重項状態や暗状態からの励起状態吸収 (ESA) を経由して起きると考えられており、励起波長の制御と合わせて、ESA に同調したレーザー光 (ESA 誘起光) により狙った部位およびタイミングで蛍光分子を光褪色させることができると期待される。本研究課題ではこれを実現するため、広視野蛍光観察において、ESA 誘起光を用いて蛍光タンパク質を光褪色させる。また、二光子励起顕微鏡においても光褪色を実証し、さらに 1 分子レベルでの光褪色法を確立する。次に、時空間集光法による広視野二光子顕微鏡において、ESA 誘起光を用いて所要の部位の蛍光タンパク質を褪色させる。これにより蛍光観察の二次元像、すなわちスライスごとに深部に向かって蛍光発光と光褪色を繰り返して観察していく。その結果をもとに蛍光観察ならびに光褪色を進めて超解像観察を試みる。

3. 研究の方法

(1) 蛍光タンパク質を褪色させる光励起法

これまでに取得した分光データをもとに緑色蛍光タンパク質 (eGFP) の光褪色の速度を観測する。波長 473 nm の CW レーザーを用いた一光子励起による蛍光発光を観察しながら、励起状態吸収 (ESA) に同調した波長 750 nm の CW レーザーを用いて eGFP を褪色させて、蛍光強度の減衰速度を測定する。二つのレーザー光の強度比と褪色速度を変えて分光結果と比較する。光褪色は不可逆過程であるので、光褪色前の初期状態の試料を供給し続けなければならないことから、試料となる蛍光タンパク質の拡散による濃度変動を抑制するため Mowiol あるいはアガロースゲルで固定する。次に、CW レーザーに代えて広帯域フェムト秒レーザーを用いて、二光子励起による蛍光発光とともに eGFP を褪色させて蛍光強度の減衰を観測する。

(2) 1 分子レベルでの光褪色

上記実験で用いた顕微鏡を全反射照明型 (TIRF) の構成に代えて (図 1) 蛍光観察において 1 分子レベルでの光褪色を観察する。観察には高感度 EM-CCD カメラを用いる。試料には蛍光タンパク質 eGFP をカバーガラス表面に固定して用いる。光褪色や光明滅に ESA 誘起光 (波長 750 nm) がどのように関与しているかを明らかにするため、暗状態に滞留する時間と光褪色するまでの時間を計測する。この結果を統計的に処理し、多分子系の蛍光計測の結果と比較する。

(3) 時空間集光法による広視野蛍光観察

時空間集光法を用いた広視野二光子顕微鏡は、試料の深部を面状に励起することが可能であり、深部観察を実現するための鍵となる技術である。光褪色用の ESA 誘起光により、所要の部位の蛍光分子を光褪色させる。実験装置は基本的に上記実験と同様であるが、ここではフェムト秒レーザーを用いて時空間集光の光学系を構築し広視野蛍光観察を試みる。

(4) 超解像二光子蛍光観察

これまでの結果をもとに時空間集光法を用いた二光子蛍光観察を 1 分子レベルで行い、さらに光褪色を試みる。1 分子レベルでの蛍光観察および光褪色からさらに進めて、光活性化局在法型の超解像観察の可能性を探索する。

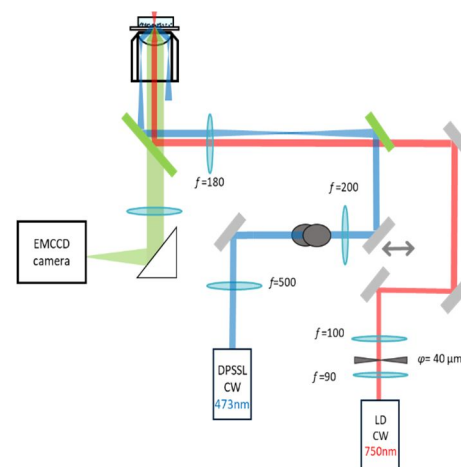


図 1 1 分子観察の実験装置

4. 研究成果

(1) 蛍光タンパク質を褪色させる光励起法

蛍光タンパク質 eGFP の光褪色速度を測定した。CW レーザー（励起光：473 nm）を用いた一光子励起による蛍光発光を観察しながら、励起状態吸収（ESA）に同調したレーザー（ESA 誘起光：750 nm）により褪色させて蛍光強度の減衰速度を測定したところ、二つのレーザー光の強度と褪色速度の関係から、これまでに取得した分光データ（[図1](#)）と整合する結果であることが確かめられた。

次に、フェムト秒レーザーを用いた二光子励起により蛍光分子の発光を観察しながら蛍光強度の減衰を観測した。CW レーザーを用いた一光子励起の実験と同様の結果が得られたものの、ESA 誘起光の有無による変化量が小さく、超解像観察に必要な程度まで意図的に光褪色を制御することは困難であった。この原因を探索するには、多分子系の蛍光観察では可逆的過程である光増減と不可逆的な光褪色が十分に区別できないこと、試料の状態に依存して褪色速度が異なることが障害であった。

(2) 1分子レベルでの光褪色

上記の原因を明らかにするため、1分子レベルで光褪色を観察することが可能な全反射照明型（TIRF）顕微鏡を構築し、これを用いて従来の蛍光タンパク質溶液を試料とした多分子系の蛍光観察と比較した。観察には高感度 EM-CCD カメラ、試料には蛍光タンパク質 eGFP をカバーガラス表面に固定して用いた。得られた蛍光画像を統計的に処理したところ、ESA 誘起光の有無による変化は認められたものの変化量が小さく、前述の結果と同様であった（[図2](#)）。また、多変量解析を行った結果、ESA に続く電荷移動が暗状態への遷移を促し、可逆的な光増減を引き起こしていること、不可逆的な光褪色はそれに連動して生じる副次的な現象であることが示唆された。

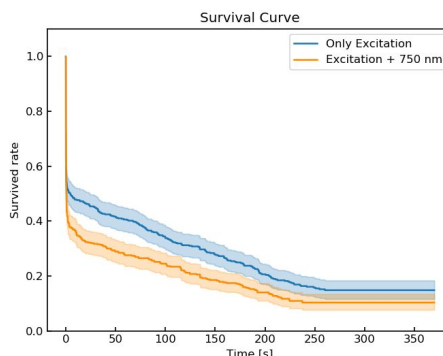


図2 eGFP の光褪色に関する生存率曲線（ESA 誘起光の有無による比較）

(3) 時空間集光法による広視野蛍光観察

落射蛍光顕微鏡に時空間集光光学系を組み込み、広視野二光子蛍光顕微鏡を構築した（[図3](#)）。中心波長 900 nm、エネルギー 1 nJ のフェムト秒レーザーを励起光として用いて、Mowiol に埋め込んだ模擬生体試料に照射し、蛍光像を CMOS カメラを用いて観察した。広視野二光子蛍光顕微鏡の基本的な性能を評価した後、中心波長 800 nm、エネルギー 15 μ J のフェムト秒レーザーを励起光に用いて、同様にして模擬試料を観察した。当初目標とした 3 次元画像の構築には深さ方向に高い解像度が必要であり、今後、励起光のスペクトル帯域を拡げて改善を進める予定である。

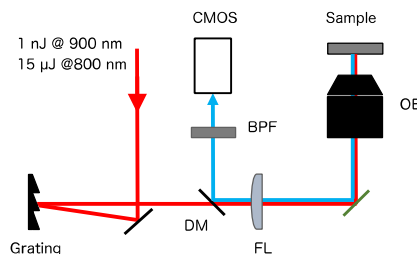


図3 広視野二光子蛍光観察の装置

(4) 超解像二光子蛍光イメージング

これまでに得られた結果から、ESA 誘起光で褪色させる方法は今後の進展に委ねることとし、別途に光活性型蛍光タンパク質を二光子励起により活性化する手法を提案した。

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).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 22 件)

坂田のどか, 前迫啓志, 神山直人, 岩田興典, 須田亮, “EGFP の光褪色過程における三重項/暗状態の過渡応答解析,” 第2回イメージングフロンティアセンターシンポジウム, 東京理科大学野田キャンパス, 2016年12月10日.

本田成, 前迫啓志, 神山直人, 戸田圭亮, 須田亮, “二次元空間変調器を用いた二光子励起蛍光及び光褪色の適応制御,” 第2回イメージングフロンティアセンターシンポジウム, 東京理科大学 野田キャンパス, 2016年12月10日.

本田成, 前迫啓志, 神山直人, 戸田圭亮, 須田亮, “2次元SLMを用いた2光子励起蛍光および光褪色の適応制御,” 第64回応用物理学会春季学術講演会, パシフィコ横浜, 2017年3月15日-17日.

坂田のどか, 前迫啓志, 神山直人, 岩田興典, 須田亮, “蛍光分子の光褪色過程における三重項/暗状態の過渡応答解析,” 第64回応用物理学会春季学術講演会, パシフィコ横浜, 2017年3月15日-17日.

S. Honda, S. Maesako, N. Kamiyama, K. Toda, and A. Suda, “Adaptive Control for Reducing Photobleaching in Two-photon Excited Fluorescence,” ALPS 2017, Pacifico Yokohama, Apr. 18-21, 2017.

N. Sakata, S. Maesako, N. Kamiyama, K. Iwata, K. Toda, and A. Suda, “Dynamics of Triplet/Dark States of Fluorescent Molecules in the Photobleaching Process,” ALPS 2017, Pacifico Yokohama, Apr. 18-21, 2017.

N. Sakata, S. Maesako and A. Suda, “Analysis of triplet/dark state dynamics of fluorescent molecules in photobleaching process,” ISIF 2017, Tokyo Univ. Science, Tokyo, Jul. 8-9, 2017.

S. Honda, S. Maesako, N. Kamiyama and A. Suda, “Adaptive control of two-photon excited fluorescence and photobleaching,” ISIF 2017, Tokyo Univ. Science, Tokyo, Jul. 8-9, 2017.

R. Kumar and A. Suda, “Bespoke microscope using macrolens for wide-field nonlinear imaging,” ISIF 2017, Tokyo Univ. Science, Tokyo, Jul. 8-9, 2017.

A. Suda, “Photobleaching properties of fluorescent proteins,” ISIF 2017, Tokyo Univ. Science, Tokyo, Jul. 8-9, 2017.

K. Takeuchi, M. Sugizawa, K. Tanaka, A. Suda, and T. Nakamura, “Optimization of biosensor and condition for FRET time-lapse imaging under two-photon excitation systems,” ISIF 2017, Tokyo Univ. Science, Tokyo, Jul. 8-9, 2017.

S. Honda, S. Maesako, N. Kamiyama, K. Toda, and A. Suda, “Adaptive control for two-photon excited fluorescence and photobleaching with a two-dimensional SLM,” CLEO-Pacific Rim 2017, Marina Bay Sands Expo and Convention Center, Singapore, Jul. 31-Aug.4, 2017.

N. Sakata, S. Maesako, N. Kamiyama, N. Iwata, K. Toda, and A. Suda, “Analysis of triplet/dark state dynamics of fluorescent molecules in the photobleaching process,” CLEO-Pacific Rim 2017, Marina Bay Sands Expo and Convention Center, Singapore, Jul. 31-Aug.4, 2017.

坂田のどか, 詫間恵, 堀内柊牙, 須田亮, “1分子蛍光顕微鏡による蛍光タンパク質の光褪色過程の観察と制御,” レーザー学会学術講演会第38回年次大会, 京都みやこめっせ, 2018年1月24日-26日.

本田成, 池谷有貴, 下村俊太郎, 前迫啓志, 須田亮, “反射型SLMを用いたフェムト秒レーザーの振幅・位相変調,” レーザー学会学術講演会第38回年次大会, 京都みやこめっせ, 2018年1月24日-26日.

坂田のどか, 秋澤一史, 詫間 恵, 神山直人, 須田亮, “蛍光タンパク質の光褪色過程における暗状態ダイナミクス,” 第79回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋国際会議場, 2018年9月19日-21日.

坂田のどか, 秋澤一史, 詫間恵, 神山直人, 須田亮, “蛍光タンパク質の光褪色過程における暗状態ダイナミクス,” 2018イメージングフロンティアセンターシンポジウム, 東京理科大学 野田キャンパス, 2018年12月15日.

高橋達也, 甲斐田幸希, 須田亮, “マクロレンズを用いた時空間集光による広視野二光子蛍光イメージング,” 2018イメージングフロンティアセンターシンポジウム, 東京理科大学 野田キャンパス, 2018年12月15日.

本田成, 矢野全一郎, 池谷有貴, 須田亮, “適応制御による蛍光タンパク質の光褪色抑制,” 2018イメージングフロンティアセンターシンポジウム, 東京理科大学 野田キャンパス, 2018年12月15日.

池谷有貴, 安藤宏樹, 須田亮, “位相制御パルスを用いた二光子励起による深部イメージング,” 2018イメージングフロンティアセンターシンポジウム, 東京理科大学 野田キャンパス, 2018年12月15日.

① 須田亮, “光パルスの時間・空間位相を操作した二光子蛍光イメージング,” 2018イメージングフロンティアセンターシンポジウム, 東京理科大学 野田キャンパス, 2018年12月15日.

② 本田成, 矢野全一郎, 池谷有貴, 須田亮, “適応制御による蛍光タンパク質の光褪色の抑制,” レーザー学会学術講演会第39回年次大会, 東海大学高輪校舎, 2019年1月12日-14日.

〔図書〕(計1件)

磯部圭佑, 須田亮, 緑川克美, 株式会社エヌ・ティー・エス 表面・界面技術ハンドブック(分担執筆 : 広帯域パルスを用いた2光子蛍光顕微鏡), 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。