

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650043

研究課題名(和文) 励起スペクトル - 蛍光スペクトル同時取得可能な走査型光学顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of scanning optical microscope capable of the excitation-emission spectral measurement

研究代表者

柴田 穰 (Shibabta, Yutaka)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20300832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：顕微鏡により、試料の蛍光スペクトルを測定する顕微蛍光分光法はこれまでよく行われてきたが、励起スペクトルの測定を効率的に行える顕微鏡システムはなかった。励起スペクトルの測定には、試料を励起する波長を走査する必要があるため、蛍光スペクトルを測定するより時間がかかるのが一般的である。フォトリソグラフィを用いてフェムト秒パルスレーザーの光を白色光に変換しそれをプリズムで分光して、励起光とした。試料の異なる場所に異なる励起波長を照射する光学設計とすることで、励起スペクトルを効率的に取得できる顕微鏡を初めて開発した。

研究成果の概要(英文)：Although the fluorescence microscopy has been applied to obtain the fluorescence spectra of a sample, it has not been applied to obtain the excitation spectra. A measurement of an excitation spectrum takes more time than that of an emission spectrum because it requires scanning of the excitation wavelength. I used the photonic-crystal fiber to convert the femto-second pulsed laser light to a white light for the excitation. I developed an optical design in which the excitation laser spots with different wavelengths are focused to different positions of the sample. This optical design enable me to realize a microscope capable of the measurement of both excitation and emission spectra.

研究分野：光生物物理化学

キーワード：顕微分光 励起スペクトル

1. 研究開始当初の背景

光学顕微鏡の技術は、現在も革新が続いており、従来空間分解能の理論的な限界と考えられてきた光回折限界を超える分解能を備えた光学顕微鏡が開発されている。一方で、蛍光スペクトルを測定することでより詳細な試料の分析を行えるようにする機能も、スペクトル測定の高効率化を目指す技術革新が行われてきた。そのような中、顕微鏡を用いて効率的に試料の励起スペクトルを測定できる顕微鏡はこれまで開発されていなかった。励起スペクトルは、試料を励起する光の波長を走査して励起波長に対する蛍光強度のプロットしたものである。励起スペクトルは、ある条件下では吸収スペクトルと等しくなるので、顕微鏡下の微小領域の吸収スペクトルを測定するのは困難な場合が多いが、励起スペクトルを測定すれば吸収スペクトルと同等の情報を得ることができるようになる。励起スペクトル測定を効率的に行えるような顕微鏡の開発は、試料の詳細な分析を行う上で、飛躍的に得られる情報量を増やすことが期待される。

2. 研究の目的

試料の微小領域の励起スペクトルを効率的に測定可能となるような、レーザー走査型共焦点顕微鏡を開発する。

3. 研究の方法

励起スペクトル測定のための白色光は、フェムト秒パルスレーザーの光をフォトニック結晶ファイバに入射することで得る。白色光は、アッペ数の大きな SF-11 ガラス製のプリズムで分光された後、レンズとスリットを組み合わせた光路を通った後顕微鏡の対物レンズに入射する。入射された白色光は、試料上で線状のスポットに集光され、スポットの端から順番に異なる波長の光が並ぶ。このような励起光で励起された蛍光は同じ対物レンズにより集められ、平行光束となった後、ダイクロイックミラーにより励起光から分離され、分光器のスリット上に集光される。試料上の線状のスポットと同じ形の像がスリット上に集光されるが、像の高さに依存して励起波長が異なっている。分光器に入射された蛍光は回折格子により分光された後、CCD カメラにより検出される。CCD カメラの横方向には、蛍光波長の異なる光が、縦方向には励起波長の異なる光が並ぶこととなる。縦方向への依存性をプロットすることで、励起スペクトルが得られる。サンプル位置をピエゾステージにより走査し、各場所での CCD の二次元像を取得することで、励起スペクトルのマップを得ることができる。

4. 研究成果

フォトニック結晶ファイバにより生成された白色光は、非常に品質の高い光学ビームであり、対物レンズにより指向性の高い平行光

束とすることができた。プリズムで分光した後、レンズとスリットの組み合わせによる光学系を組んで、白色光のスペクトルのうち必要となる波長領域だけを取り出すフィルターとした。小型分光器で観測されたスペクトルは非常に良好で、フィルター光学系の機能も問題なく動作することが分かった。試料の走査は、ピエゾステージにより行う。そのため、検出用 CCD カメラと同期してピエゾステージをスキャンする LabView のプログラムを作成した。

標準試料として、ナイルブルーの溶液を用いて開発している顕微鏡の動作確認を行った。その結果、概ね期待通りの動作、性能が得られることが分かった。一方で、フォトニック結晶ファイバから出力される白色光のスペクトルは時間とともに若干揺らぎがあることが判明し、これを補正するための対策が必要となることが分かった。そのため、プリズムで分光する前の白色光の一部を直接蛍光を測定するための分光器スリットへ入射し、試料からの蛍光と同時に励起レーザーのスペクトルも測定できるように改良することとした。これについては、現在も作業が続いている。

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)

Yoshitaka Saga, Tatsuya Saiki, Naoya Takahashi, Yutaka Shibata, and Hitoshi Tamiaki, Scrambled Self-Assembly of Bacteriochlorophylls c and e in Aqueous Triton X-100 Micelles, *Photochem. and Photobiol.* 90, 552-559 (2014). DOI: 10.1111/php.12219 査読有

Yutaka Shibata, Wataru Katoh, Tomofumi Chiba, Keisuke Namie, Norikazu Ohnishi, Jun Minagawa, Hanayo Nakanishi, Takumi Noguchi, and Hiroshi Fukumura, Development of a novel cryogenic microscope with numerical aperture of 0.9 and its application to photosynthesis research, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 880-887 (2014). DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.03.006 査読有

Ali Mohamed, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, Hiroshi Fukumura, and Yutaka Shibata, Structure-based modelling of fluorescence kinetics of photosystem II: relation between its dimeric form and photoregulation, *J Phys Chem B*, 120, 365-376 (2016). 査読有

[学会発表](計 21 件)

Hamza Al-Kindi, Ahmed Ali, Shinji

Kajimoto, Izabela Rzeznicka, Yutaka Shibata, Hiroshi Fukumura, Photo-Physicochemical Processes of Gold Nanoclusters Synthesized in Bovine Serum Albumin
27th International Conference on Photochemistry, June 28-July 3, 2015, International Convention Center Jeju, Jeju, Korea

Ahmed Ali, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, Hiroshi Fukumura, Yutaka Shibata
Refined Compartment Target Analysis of Photosystem II-Enriched Membrane based on Its Structure
27th International Conference on Photochemistry, June 28-July 3, 2015, International Convention Center Jeju, Jeju, Korea

田原 一輝、河原 弘典、浪江 慶祐、井上名津子、長尾 遼、加藤 祐樹、鞆 達也、柴田 穰、福村 裕史、菓子野 康浩、野口 巧、光合成タンパク質と金属ナノ粒子による水素発生人工光合成ナノデバイスの開発
第5回光合成学会年会、2014年5月30-31日、近畿大学

柴田 穰、理論と実験の融合で見えてきた植物型光合成の超高速光反応
第11回AMO討論会、2014年6月6-7日、大阪大学
(招待講演)

柴田 穰、千葉 知史、福村 裕史、新開発の開口数0.9の極低温光学顕微鏡による細胞内光合成タンパク質の不均一分布測定
第36回日本光医学・光生物学学会年会、2014年7月25-26日、大阪大学

柴田 穰、開口数0.9の極低温顕微鏡の開発と光合成タンパク質の1分子分光への応用
日本分析化学会 第63年会特別シンポジウム、2014年9月17日、広島大学
(招待講演)

千葉 知史、福村 裕史、柴田 穰、極低温顕微鏡を用いた緑化途上トウモロコシ生葉の光合成タンパク質前駆体の空間分布の測定
日本生物物理学会第52回年会、2014年9月25-9月27日、札幌コンベンションセンター

Ahmed Ali, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, Hiroshi Fukumura, Yutaka Shibata, Target analysis of the photosystem II-enriched membrane: The effect of oxidizing agent on the fluorescence quenching in PSII

日本生物物理学会第52回年会、2014年9月25-9月27日、札幌コンベンションセンター

田原 一輝、河原 弘典、浪江 慶祐、井上名津子、長尾 遼、加藤 祐樹、鞆 達也、柴田 穰、福村 裕史、菓子野 康浩、野口 巧、光合成蛋白質と金属ナノ粒子による水素発生人工光合成ナノデバイスの開発
日本生物物理学会第52回年会、2014年9月25-9月27日、札幌コンベンションセンター

柴田 穰、谷山 航一朗、Ahmed Ali、小杉 真貴子、福村 裕史、ピコ秒時間分解蛍光分光による極地に生育する蘚類および藻類の乾燥耐性の分子機構の研究
第54回日本植物生理学会年会、2015年3月16-18日、東京農業大学

柴田 穰、植物型光合成タンパク質の高効率かつ柔軟な光捕集
分子系の複合電子機能第181委員会 第22回研究会、2015年7月7-8日、大阪大学
(招待講演)

柴田 穰、杜 婷、長尾 遼、野口 巧、福村 裕史、シアノバクテリア光化学系I三量体の液体窒素温度における単一分子蛍光分光
第23回 光合成セミナー2015：反応中心と色素系の多様性、2015年7月11-12日、龍谷大学大宮キャンパス

千葉 智史、柴田 穰、福村 裕史、緑化途上トウモロコシにおける光合成タンパク質 assembly 中間体の空間分布観測
第23回 光合成セミナー2015：反応中心と色素系の多様性、2015年7月11-12日、龍谷大学大宮キャンパス

Hamza Al-Kindi, Mayu Nakagomi, Rie Kusama, Ahmed Ali, Shinji Kajimoto, Izabela Rzeznicka, Yutaka Shibata, Hiroshi Fukumura, Two-Photon Fluorescence of Protein-Protected Gold Nanoclusters of Different Sizes (Au8, Au25)
第37回日本光医学・光生物学学会年会、2015年7月17-18日、シーガイアコンベンションセンター

柴田 穰、新開発の極低温顕微鏡による光合成研究の新展開
平成27年度化学系学協会東北大会、2015年9月12-13日、弘前大学文京キャンパス
(招待講演)

伊藤 稚菜、鷺山 研人、福村 裕史、柴田 穰、クラミドモナスのステート遷移における

光捕集タンパク質の移動を極低温顕微分光法で検証する
平成 27 年度化学系学協会東北大会、2015 年 9 月 12-13 日、弘前大学文京キャンパス

千葉 知史、福村 裕史、柴田 穰、極低温顕微鏡を用いた緑化途上トウモロコシ生葉の光合成タンパク質前駆体の空間分布の測定
日本生物物理学会第 53 回年会、2015 年 9 月 13-15 日、金沢大学 角間キャンパス

Du Ting, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, Hiroshi Fukumura, Yutaka Shibata, Fluorescence spectroscopy of single Photosystem I at liquid nitrogen temperatures
日本生物物理学会第 53 回年会、2015 年 9 月 13-15 日、金沢大学 角間キャンパス

柴田 穰, 千葉 智史, 福村 裕史, 極低温顕微鏡を用いた緑化途上トウモロコシ生葉の光合成タンパク質構築過程の追跡
第 55 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日、岩手大学

Du Ting, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, Hiroshi Fukumura, Yutaka Shibata, Fluorescence spectroscopy of single Photosystem I at liquid nitrogen temperatures
第 55 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日、岩手大学

21 伊藤 稚菜, 鷲山 研人, 福村 裕史, 柴田 穰, クラミドモナスのステート遷移における光捕集タンパク質の移動を極低温顕微分光法で検証する
第 55 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日、岩手大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://opc.chem.tohoku.ac.jp/j/>

6. 研究組織
(1)研究代表者
東北大学・理学研究科・准教授
柴田 穰 (SHIBATA Yutaka)

研究者番号：20300832

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：