

時間分解超解像度顕微鏡技術の開発

所属：大阪市立大学 大学院理学研究科 数物系専攻

助成対象者：杉崎 満

共同研究者：近藤 政晴（名古屋工業大学）

出羽毅久（名古屋工業大学）

概要

光合成初期過程の実時間実空間観測を実現するために、特に近赤外領域で効率よく画像取得が可能となる超解像度顕微鏡を試作した。顕微鏡の解像度の鍵となる誘導放出の効率を最適化するために、色素ごとに照射レーザーのパルス間隔をコントロールできるように光学配置の工夫を行った。STEDレーザーを照射時の蛍光失活の効率は80%となり、その結果、回折限界を超えた超解像度顕微鏡画像の取得に成功した。また、単純な二準位系を形成しない光合成色素の超解像度を取得するために必要となる、非線形感受率と内部転換の情報を得るために、スペクトル分解四光波混合信号の測定を行った。その結果、カロテノイドにおいては200フェムト秒以下の早い時間領域で応答が現れる電子状態の存在が認められた。

abstract

A super-resolution microscope having high sensitivity especially in the near-infrared region has been constructed to establish methodology for measuring the early events of photosynthesis with high spatiotemporal resolution. We employed an optical configuration for controlling the temporal separations of laser pulses, which plays a crucial role to attain the efficient stimulated emission rate from fluorophores. The fluorescence

depletion rate of 80% has been attained and thus clear images with super-resolution beyond the diffraction limit have successfully been obtained. Spectrally-resolved four-wave mixing signals have also been measured to obtain the information about optical nonlinearity and internal conversion rates of photosynthetic pigments having complicated energy structures. A possible involvement of a dark state around 200 fs after the optical pump has been discussed experimentally and theoretically.

研究内容

1. 背景

顕微鏡の歴史を紐解いてみると、約 400 年前にオランダの Janssen 親子や van Leeuwenhoek に始まったとされている。特に van Leeuwenhoek の作製した顕微鏡は空間分解能が $1.4\mu\text{m}$ にも達していたといわれている。現在市販されている通常の光学顕微鏡は、回折限界によって決まる理論的な空間分解能（約 200nm）の極限まで達成している。しかしながら、このことを言い換えると、光学顕微鏡の空間分解能は、400 年の間に僅か 7 倍程度しか向上していないということになる。

この状況を一気に打開したのは、1994 年にフィンランド（現在は独国マックスプランク研究所）の S.W. Hell 博士により理論的な提案がされた STED 法である^{1, 2}。この原理に基づいた STED 顕微鏡が、数年前よりドイツの Leica 社から市販されている。市販の STED 顕微鏡を用いて効率よく超解像度画像を得ることためには、特別の蛍光ビーズやラベルを用いて試料を染色し、その蛍光顕微イメージを観測する必要がある³。この時、究極的には、個々の分子の骨格構造（原子核の配列）や分子の配列情報を知ることとなる。しかし光学顕微鏡を用いた場合、その顕微イメージは試料による光の吸収や蛍光過程を反映するために、十分な空間分解能があれば電子の位置情報を得ることも可能になる。蛍光マーカ等を用いて試料を染色した場合には、個々の試料の電子情報ではなく、単に蛍光マーカの電子情報が得られるにすぎず、貴重な情報を失うこととなる。

また、STED 顕微鏡に期待される次のステップとして、時間分解顕微画像の取得があげられる。測定試料自体が蛍光を発する場合には、蛍光マーカ等を用いずに超解像度顕微イメージの測定が可能となる。時間と空間の極限状態の顕微鏡画像を得ることができれば、時々

刻々と移動していく電子の動きをアニメーションのようにとらえることができるようになる。STED法の更なる発展系としての応用が期待できる。

2. 目的

本研究は以下の項目を実施することにより、上述の諸問題を解決することを目的としている。すなわち

- ① 解像度蛍光顕微鏡技術のピコ秒・フェムト秒時間領域への拡張
- ② 透過型超解像度顕微鏡の開発、

更に、開発を行う新しい超解像度顕微鏡法の有効性を示すために、

- ③ 光合成初期過程の解明

に取り組む。光合成細菌が行う光合成の初期過程を担うのは、光合成膜中に規則正しく配列したアンテナ色素蛋白超分子複合体という天然のナノデバイスである。先述のようにSTED法は、空間分解能が非常に高く、光合成膜中に配列した色素蛋白複合体を観測するために、非常に有用な手法と考えられる。光合成色素蛋白複合体中の励起エネルギー移動過程の実時間観測を可能とするためには、超解像度顕微鏡へのパルスレーザーシステムの組み込みを行うとともに、パルスレーザーに対する線形、及び非線形光学応答に対する知見が予め必要となる。

3. 結果

A) 超解像度顕微鏡の構築

独自に構築した超解像度顕微鏡に、今回の研究助成により購入をしたパルスレーザーを導入した。STED顕微鏡観測を行うためには2つのレーザー光を、観測試料の電子励起状態に合わせたタイミングで光照射を行う必要がある。従来のSTED顕微鏡観測では、試料を一定の色素で染色をした上で形状観測が行われていたが、今回の研究では、試料それ自体の電子状態の寿命を反映した光学応答を利用し、超解像度顕微鏡画像を得ることを目指している。そのため、試料ごとに時間遅延を最適化できるように、光学系を工夫した。本研究では特に光合成色素の光学応答に着目をするため、光学遅延は数ピコ秒の範囲で変えられるようにしてある。一例として図1(a)に時間遅延を10ピコ秒に合わせた状態を示す。

良質の超解像度顕微鏡画像を得るためには、励起レーザーとSTEDレーザーが重なった領域で、効率よく蛍光の失活を起こさせる必要がある。光学系を工夫することにより、現在、80%程度の失活を起こさせることに成功している。その結果、図1(b), 1(c)に示すように、超解像度画像を得ることに成功している。今後のさらに高分解能の画像の取得が

できるように改良を続ける必要がある。

B) 光合成色素の超高速過程

STED 顕微鏡観測を行う際、試料の染色に用いる蛍光物質に必要とされる条件の一つとして、はっきりとした二準位系を形成していることがあげられる。三つ以上の準位をうまく用いることにより、STED 顕微鏡観測を行うための手法もいくつか報告がなされてきているが、一般的にそのような手法は、二準位系の場合に比べ複雑になる。背景で述べたように、染色物質ではなく、試料そのものの蛍光を観測することが可能となれば、たとえば物質間でエネルギーをやり取りする様子を原子スケールで観測可能となる。これを実現するためには、電子状態の時間スケールをあらかじめ見積もり、STED 顕微鏡観測に用いる全てのレーザーの波長と、試料にレーザーを照射するタイミングに対する戦略を立てておく必要がある。このことは、単に効率の良い励起の条件を見積もるというだけではなく、二光子吸収過程などの非線形光学効果により、実効的な誘導放出過程の減少による顕微鏡画像の劣化を最小限に抑える条件を探索することを意味する。

このような点を鑑みて、研究実施期間中にいくつかの光合成色素の超高速光学応答、及びエネルギー伝達過程を調査した。ここではその一例として代表的なカロテノイドであるβ-カロテンについて非線形光学応答の時間変化を調べた結果について述べる。自然界に700種類以上存在するといわれているカロテノイドは、光合成初期過程において光捕集や光保護の役割を担う重要な色素として知られている⁴。そこでは、カロテノイドからクロロフィルへの超高速・低エネルギー損失での励起エネルギー移動が起こることから、その

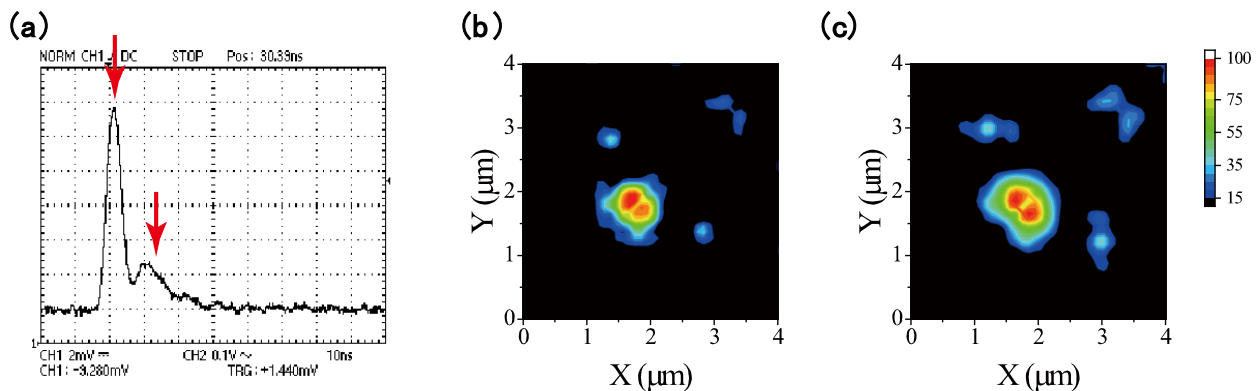


図 1: (a) 顕微鏡測定に用いる 2 つのレーザーパルスの時間遅延の様子。これらのレーザーを用いて測定した超解像度顕微鏡画像 (b) と通常の蛍光顕微鏡画像 (c)。空間分解能が格段に向上していることが分かる。

機構を明らかにするために、多くの研究グループがコヒーレント分光を試みてきている⁵⁻⁷.

「カロテノイドは可視領域にいくつの電子状態を持つのか?」という問いは、光合成の初期過程を理解し、さらには太陽電池などに応用するうえで非常に重要となってくるが、その詳細についてはいまだ多くの点で謎が残されている。

研究期間中に測定装置の改良により、広いスペクトル領域で三次非線形光学応答を示す四光波混合信号測定が可能となった。図 2(a)のように β -カロテンの非線形光学応答を反映して、スペクトルは時間とともにそのピークエネルギーが変化していくことが分かる。図 2(b)で示すように、量子光学の基本原理に基づいたモデル計算を行った結果と比較をしてみると、一見、「ピークエネルギーが高エネルギー側に移動しながら強度が増加していく」という実験結果をよく再現しているように思われる。しかしながらその時間スケールや信号強度は、実験で観測された値と全く異なっている。また、図 2(c)で示すように、定常吸収スペクトルの実験結果を同じモデルを用いて解析してみると、同じエネルギー領域においてだけ、不一致がみられる。すなわちこの領域に隠れた電子状態が存在することを示唆している。

4. 今後

前節に述べた結果に加え、研究実施期間中に、光合成の初期過程において、光捕集とそ

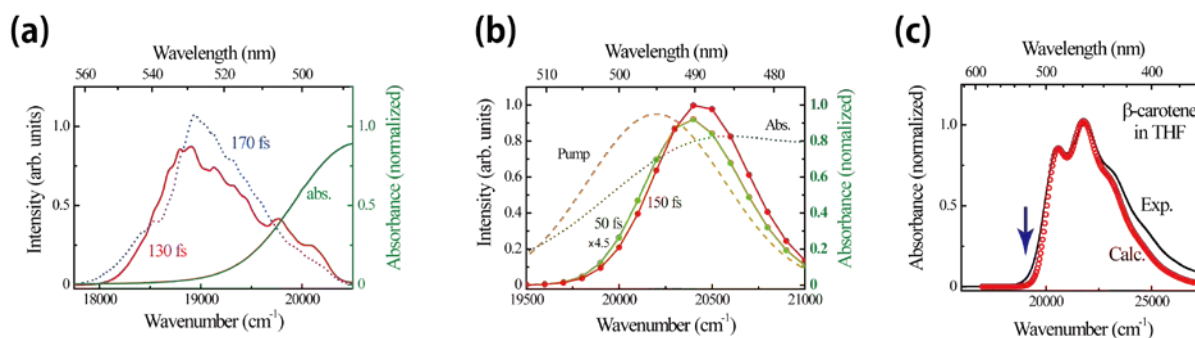


図 2: (a) β -カロテンの三次非線形光学応答スペクトル。時間の経過とともに、応答のピークが高エネルギー側に移動するとともに、その強度も増加する。(b) ブラウニア振動子モデルを用いて三次非線形光学応答スペクトルの時間発展を計算した結果。実験結果をよく反映しているように見えるが、その応答時間や強度について僅かな不一致がみられる。50fs のスペクトルは 4.5 倍拡大して表示してあることに注意。(c) 線形吸収スペクトルの実験（実線）と計算（丸印）の比較。全体的に形状が一致しているように見えるが、矢印の近傍で不一致がみられる。

のエネルギー伝達の中心的役割を果たすクロロフィルに関しては，吸収端近傍で非線形光学効果が顕著に表れることを見出した．このことは，STED 顕微鏡観測を行う際に重要となってくる誘導放出過程と非線形誘導吸収過程の競合を考慮することが重要であることを意味している．現在のところ，この問題を回避するために，レーザー光のエネルギーの選択と積算時間の短縮化（いわゆる g-STED 法）の組み合わせが有効であると考えている．この最適化条件を今後の研究により求めることは，より一般的な物質の超解像度顕微鏡観測を可能にするための指針を導くことに繋がると期待している．

謝辞

本研究課題は，住友電工グループ社会貢献基金学術・研究助成を受けることにより遂行することができました．ご理解，ご支援をいただいた方々に，心よりお礼申し上げます．

引用文献

- 1 S. W. Hell and J. Wichmann, *Opt. Lett.* **19**, 780 (1994).
- 2 S. W. Hell, in *Top. Fluoresc. Spectrosc.*, edited by J. R. Lakowicz (Plenum Press, New York and London, 1997), Vol. 5, p. 361.
- 3 J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (Springer, New York, 2006).
- 4 T. Polívka and V. Sundström, *Chem. Rev.* **104**, 2021 (2004).
- 5 G. D. Scholes, G. R. Fleming, A. Olaya-Castro, and R. van Grondelle, *Nat. Chem.* **3**, 763 (2011).
- 6 S. F. Huelga and M. B. Plenio, *Nat. Phys.* **10**, 621 (2016).
- 7 M. Sugisaki, D. Kosumi, K. Saito, R. J. Cogdell, and H. Hashimoto, *Physical Review B* **85**, 245408 (2012).

本助成に関わる成果

[ポスター発表]

杉崎満，南後守，天尾豊，「スペクトル分解をした β -カロテンの四光波混合信号」，日本物理学会第 70 回年次大会，金沢大学 角間キャンパス，2016 年 9 月 13 日～16 日．