

超広帯域フェムト秒レーザーの周波数位相制御による蛍光蛋白の選択的2光子励起蛍光発生

Selective generation of two-photon-excited fluorescence of fluorescent proteins with spectral phase optimization of an ultrabroadband pumping laser pulses.

田中将大(M2)

M. Tanaka

Abstract

Two-photon excitation with ultrabroadband femtosecond laser is adaptively controlled by a computer controlled pulse shaper. When the second-harmonics spectrum is shaped with spectral phase modulation to match with the two-photon excitation spectrum of proteins, fluorescence of the specific protein in mixtures can be enhanced with specified enhancement factors. Moreover, a simpler spectral shaping scheme is established without the adaptive control to selectively excite the specific protein.

1 はじめに

ポストゲノム時代を迎え、生体機能解析が生化学分野における研究の主要なテーマになっている。生体細胞組織をリアルタイムに可視化し、分子レベルの大きさで観測することが可能な蛍光顕微鏡は生体機能解析における非常に有力な観測ツールとして用いられている。近年では、広帯域なフェムト秒レーザーを用いて通常の1光子励起蛍光顕微鏡では観測できない生体深層の観測を可能にする2光子励起蛍光顕微鏡が注目を集めている[1]。しかし、広帯域な光源を用いると蛍光共鳴エネルギー移動(FRET: Fluorescence Resonant Energy Transfer)などの選択的に異なる蛍光蛋白を励起する必要がある観測法には用いることができない[2]。そこで、広帯域光源を用いて蛍光蛋白を選択的に励起する方法として、位相変調を与え2次高調波(SH: Second harmonic)スペクトルを整形し選択的に励起する方法が提案されている[3]。2光子蛍光量は、光源のSHスペクトル $E^{(2)}(\omega)$ と蛍光蛋白の2光子励起の積 $g^{(2)}(\omega)$ で書き表すことができ、以下の式ようになる。

$$I_{\text{signal}} = \int_{-\infty}^{\infty} g^{(2)}(\omega) |E^{(2)}(\omega)|^2 d\omega \quad (1)$$

光源のSHスペクトルは次式で書き表すことができる。

$$|E^{(2)}(\omega)|^2 = \left| \int_{-\infty}^{\infty} A(\omega_0/2 + \Omega) A(\omega_0/2 - \Omega) \times \exp[i\{\Phi(\omega_0/2 + \Omega) + \Phi(\omega_0/2 - \Omega)\}] d\Omega \right|^2 \quad (2)$$

A は振幅、 ω_0 は中心周波数、 Φ は位相である。

(2)式より、光源の位相を変調することによってSHスペクトルを整形可能なことが分かる。これまで提案されている Sin 関数のような単純な位相関数では[3]、必ずしも蛍光を完全に抑制することはできないので、コントラストを最大化する関数にはなりえない。そこで、我々は適応制御を用いて蛍光強度とコントラスト比を指標に最適化を行うことで、Sin型変調よりもコントラストの比向上を図るだけでなく、所望の蛍光強度を保ったままコントラスト比の最大化を行った。また、適応制御を用いて2種類の蛍光蛋白の蛍光強度を任意の蛍光強度が得られること示す。

2 適応制御による選択的励起実験

実験装置を Fig.1 に示す。光源には Nanolayers 社製 VENTEON[PULSE: 1, サブ 6 fs パルス Ti:sapphire レーザー、中心波長 870 nm、スペクトル幅 340 nm (700 nm to 1040 nm)、繰り返し周波数 75MHz、平均パワー200 mW を用いた。光源から出射した光は 4-f 波形整形器によって位相変調され、ビームスプリッターで二つに分けられた光パルスはそれぞれ異なる蛍光蛋白質に入射し、光電子増倍管 (PMT: Photo Multiplier Tube) で蛍光を測定する。試料には SeBFP(30 mg/cc) と EGFP(30 mg/cc) を用いて適応制御実験を行った。コスト関数として蛍光強度の比、試料1/試料2と FTL パルス入射時の蛍光強度に対する制御後の蛍光強度の比、蛍光強度(制御後)/蛍光強度(FTL) を閾値として設定し閾値以下には蛍光強度が下がらないような条件下で適応制御を行いコントラストの最大化を行った。Fig.2 に選択的励起の結果を、Fig.3 に SH スペクトルの変化を示す。

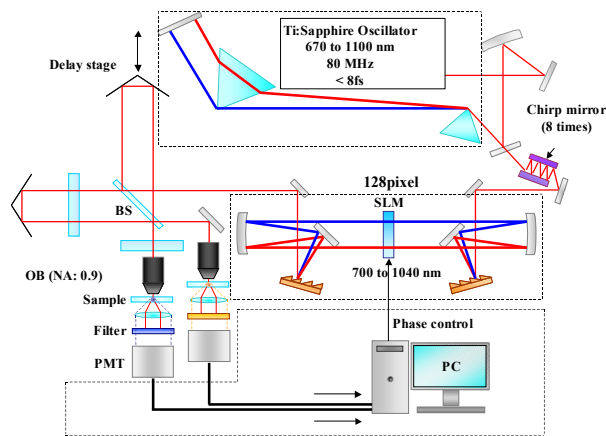


Fig.1 Experimental set up for two-photon excitation spectra measurement. OB: objective, BS: beam splitter, SLM: spatial light modulator.

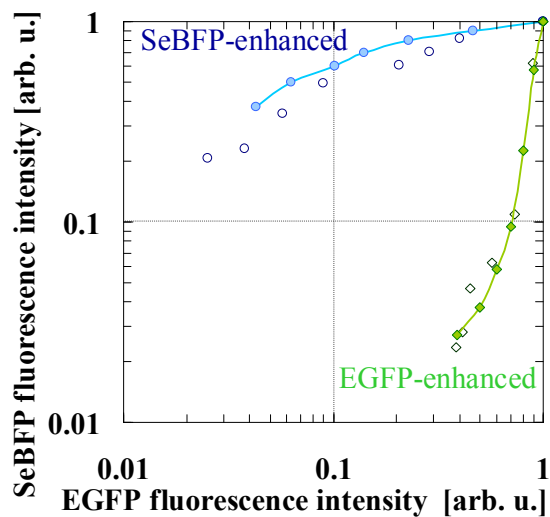


Fig.2 Selective excitation result. SeBFP enhanced, open circle: experimental, solid circle: calculation. EGFP enhanced, open rhombus: experimental, solid rhombus: calculation.

Fig.2 は適応制御により SeBFP, EGFP の蛍光強度が一定になるようにしてコントラスト比を最大化したときに得られる EGFP, SeBFP の蛍光強度の値をプロットしたものである。実験上で得られた値をそれぞれ、○、◇でプロットしている。●と◆は(2)式より数値計算上で適応制御を行い同様にプロットしたものである。実験では、SeBFP : EGFP = 8:1, 1:16, 数値計算上では、SeBFP : EGFP = 9:1, 1:14 のコントラスト比が得られ、

非常に良く一致している。この結果から、広帯域光源で励起した場合にも 2 光子蛍光量は単純に 2 光子励起スペクトルと光源の SH スペクトルの積でモデル化できるということが明らかになった。また、数値計算によって得られた最適マスクを実験系に適応すると SeBFP:EGFP =7:1, 1:4 のコントラスト比しか得られなかった。これは、実験系に適応する際に光源の分散補償が十分にできていなかったために、数値計算上で得られた位相を正確に与えられなかったからである。特に EGFP のコントラスト比が数値計算に比べて悪いので長波長側での分散補償が十分ではなかったと考えられる。本実験で用いたような光源が不安定なレーザーの場合には数値計算上で位相マスクを作ってもずれる可能性が高いので、コントラスト比を最大化したい場合には実験上で適応制御を行うのが望ましい。また、Sin 関数と等価な三次分散を励起スペクトルのピーク波長を中心波長として与え、選択的励起を試みたところ SeBFP : EGFP =4:1, 1:5 のコントラスト比となり適応制御の結果の方が優れたコントラスト比を得ることが分かった。

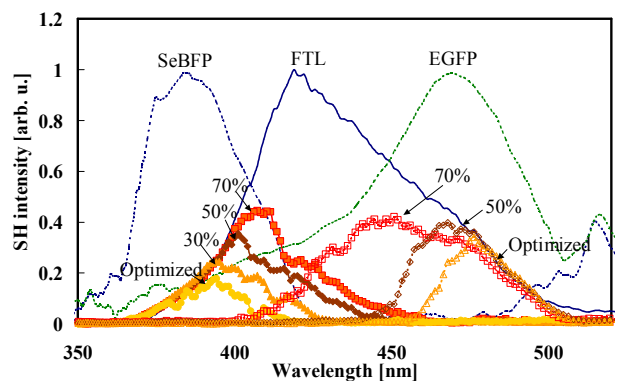


Fig. 3 Changes of SH spectra of SeBFP enhanced and EGFP enhanced. Dashed lines, Two-photon excitation spectra of SeBFP and EGFP. SeBFP: SH intensities are 20, 30, 50, 70% against the FTL, EGFP: SH intensities are 40, 50, 70% against the FTL.

Fig.3 は設定した閾値に対して、SH スペクトルの変化を示したものである。閾値を減少させてコントラスト比を最大化させていくと、励起スペクトルの励起効率が高く、蛍光を抑える側の励起スペクトルの励起効率が低いところへ SH スペクトルが形成して行っているのが分かる。Fig.4 はそれぞれ最大コントラスト比が得られたときの SeBFP と EGFP の位相であるが、Sin 関

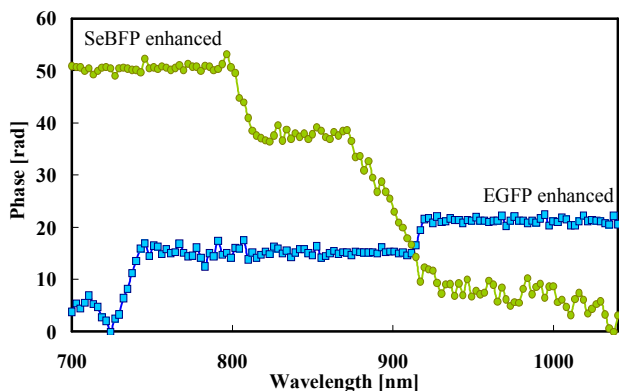


Fig.4 Phases of maximized contrast ratios by adaptive control. Solid circle: SeBFP enhanced, Solid square: EGFP enhanced.

数のような単純な位相関数ではない。この結果からも蛍光を抑える波長域には複雑な位相を印加して、和周波が発生しないようにしていることが分かる。

次に、適応制御を用いて SeBFP と EGFP の蛍光強度を任意に制御できるか実験を行った。その結果を Fig.5 に示す。▲のラインは SEBFP の蛍光強度を 19% に維持したままコントラスト比を SeBFP:EGFP=1:0.7, 1:1, 1.2, 1.3 に制御した場合で、■のラインは SEBFP の蛍光強度を 30% に維持したまま、コントラスト比を SeBFP:EGFP=1:0.7, 1:1, 1.2, 1.4 に制御した場合である。

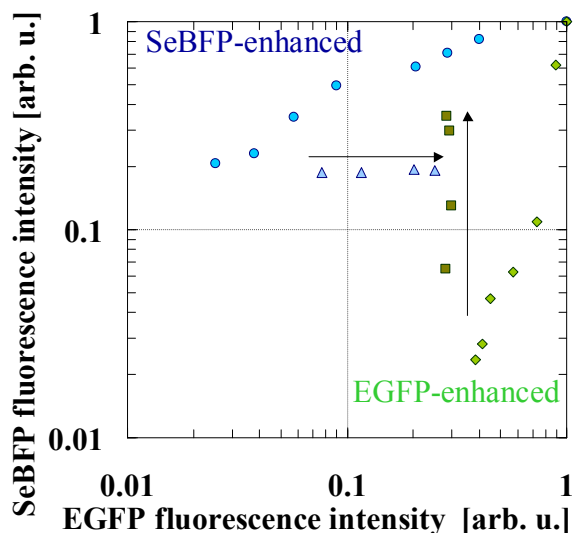


Fig.5 Arbitrary fluorescence experiment. Circle and rhombus: contrast maximization results. Triangle and square are arbitrary fluorescence operations. Horizontal line: SeBFP fixed, EGFP variable, vertical line: SeBFP variable, EGFP fixed.

いずれの場合も強度を維持する側が数%以内の誤差に留まり、コントラスト比としては 10%以内の誤差の範囲で任意の蛍光強度に制御することができている。

しかし、適応制御による蛍光強度の制御は正確であるが蛍光強度の細かな調整の度に、制御を行う必要があるため調整に時間が掛かってしまい実用的とは言えない。そこで位相関数に簡単なパラメータを導入して任意の蛍光強度を得ることがどうか数値計算を行ってみた。Fig. 6 に導入する位相関数と Fig.7 にパラメータ操作によって得られる蛍光強度の変化を示す。

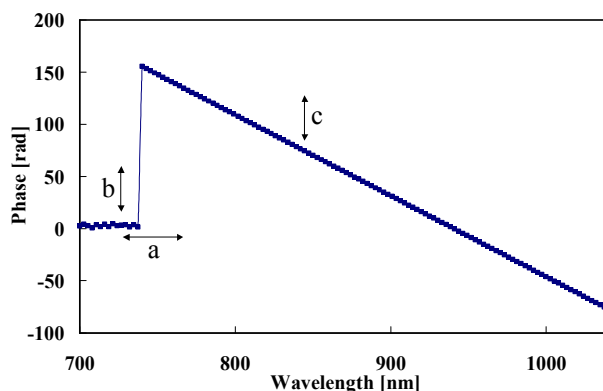


Fig.6 Spectral phase for arbitrary fluorescence operation. a: wavelength division, b, and c: phase depth.

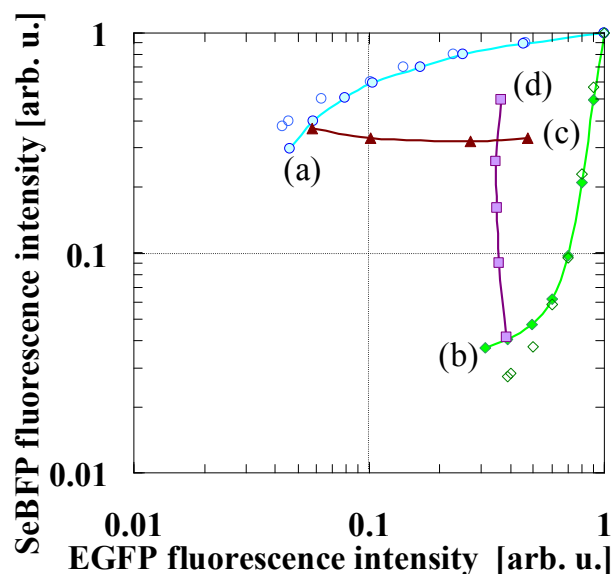


Fig. 7 Arbitrary fluorescence calculation result. Open circle and open rhombus: maximized contrasts against each fluorescence intensity. Solid circle and solid rhombus: pixel division variable. Solid triangle and solid square: phase depth variable.

Fig.6 は全波長にランダムな位相を与え和周波が発生しないようにしてあり、SLM のピクセルを分割する波長を a 、そのとき分けた領域で与えるランダム関数の位相深さを b と c とし、分けられた領域の一方には 100fs の時間遅延を与えている。遅延時間は分けられた 2つの領域同士の和周波が発生しないように与えるものであり Fig. 7 のように蛍光強度を変化させる際には遅延時間を変化させる必要はない。よって、これら a , b , c の 3つのパラメータを変えることによって、連続的に蛍光強度を変化させることができる。(a), (b)は波長分割領域だけを変えるだけで連続的に操作できる。(c), (d)は位相深さ b , c のみを変化させるだけで連続的に蛍光強度を操作することができるので、この位相関数を導入すれば、実験上においても非常に有効なツールとなることが示された。現段階では片方の蛍光強度を維持しようと考えた場合に、蛍光強度として 10%程度の強度の揺れが生じるが、実験上はさほど問題にはならないと考えている。ランダム関数の代わりに適応制御で和周波を最も抑制することができる位相を作製し、位相関数として導入すればさらに制御性を向上させられるはずである。

3 結論

適応制御を用いることで従来法である Sin 型変調よりもコントラスト比が得られることが分かった。また、適応制御の結果と数値計算の結果が一致したことから、広帯域光源を用いた場合でも単純なモデルで 2 光子蛍光を記述することが分かり、複雑な励起過程などが誘起され蛍光に影響が生じていないことを確認した。

適応制御を用いて 2 種類の蛍光強度を任意の蛍光強度へと同時に制御できることを示した。この操作により試料作成の手間を省き蛍光顕微計測の効率化を図ることが可能になる。同様の操作を簡単な位相関数とパラメータを変えるだけで行えることを示し、蛍光強度調整の効率化を図れることを数値計算上で示した。

4 謝辞

本研究は理化学研究所緑川レーザー物理工学研究室主任研究員緑川克美博士のもとで、実験環境を提供していただき、副主任研究員須田亮博士の指導を受けて行われました。共同研究者である、同研究室磯部圭

佑博士に厚く御礼申し上げます。また、研究試料である蛍光蛋白質の精製や蛍光顕微鏡についてご教授いただいた脳科学研究センター先端技術開発グループ宮脇敦史博士、水野秀昭博士にも厚く御礼申し上げます。

References

- [1] W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb, *Nature Biotech.* 21, 1369 (2003).
- [2] G. Y. Fan, H. Fujisaki, A. Miyawaki, R.-K. Tsay, Roger Y. Tsien, and Mark H. Ellisman, *Biophys. J.* 76, 2412 (1999).
- [3] I. Pastirk, J. M. D. Cruz, K. A. Walowicz, V. V. Lozovoy, and M. Dantus, *Opt. Exp.* 11, 1695 (2003).