

過渡蛍光検出赤外分光による超解像イメージング

酒 井 誠・井上 圭一・藤井 正明

Super-Resolution Imaging Based on Transient Fluorescence Detected IR Spectroscopy

Makoto SAKAI, Keiichi INOUE and Masaaki FUJII

The IR microscope has been used widely for following reasons: 1) IR absorption spectrum of small samples and domains can be measured, 2) without causing any damage, and 3) spatial mapping of specific materials by IR is possible. However, the spatial resolution of IR microscopes is very poor relative to other optical microscopes. This is because the spatial resolution of a conventional IR microscope is restricted by the diffraction limit, which is almost the same as the wavelength of IR light. If a specific IR absorption band can be mapped with sub-micron spatial resolution, visualization of the molecular structure and reaction dynamics in a non-uniform environment such as a cell becomes a possibility. In this paper, we introduced a novel IR super-resolution microscope combining a laser fluorescence microscope and transient fluorescence detected IR spectroscopy. We also demonstrated IR imaging on the *Arabidopsis thaliana* cells labeled by rhodamine-6G.

Key words: IR microscope, super-resolution imaging, 2-color laser microscopy, transient fluorescence detected IR spectroscopy, cell

赤外顕微鏡は、1) 分子の指紋である赤外吸収スペクトルを微小試料においても測定が可能である、2) 非破壊・非侵襲分析である、3) 特定物質の赤外イメージング測定ができる、等の利点から微小構造分析に有用である。その一方で、他の顕微分光法に比べて空間分解能がきわめて低いという問題点がある。これは赤外波長に起因する。光学顕微鏡の空間分解能は、回折限界で一意に決まるが、これはおよそ光の波長と同程度である。赤外顕微鏡の場合、2.5~25 μm の赤外波長領域の光を用いるので必然的に 10 μm 程度の空間分解能しか得ることはできない。したがって、この回折限界を凌駕する空間分解能、すなわち“超解像”を有する赤外顕微鏡の開発が大きな研究課題となっている¹⁻⁴⁾。もし、特定の赤外吸収の空間分布を、例えば細胞のサイズ以下でマッピングし、その時間的な変化を追跡することが可能となれば、細胞内部のような不均一な環境で起こる反応ダイナミクスをアニメーションのように可

視化することも実現できるはずである。

われわれは、これらを実現すべく、二波長分光法のひとつである過渡蛍光検出赤外分光法を顕微鏡技術に応用した新規な赤外超解像顕微鏡の開発を行った^{5,6)}。この赤外顕微鏡は赤外波長領域において、回折限界を凌駕する空間分解能、すなわち“超解像”を有し、ナノスケール時代の新たな分光法として期待されるものである。本稿では、赤外超解像顕微鏡の原理紹介とともに、色素染色した細胞への適用例もあわせて報告する。

1. 超解像を達成するには

光学顕微鏡において、回折限界を突破する“超解像”を達成し空間分解能を向上しようという試みは古くから盛んに行われている。例えば、瞳関数操作、短波長化 (X 線顕微鏡等)、光源の多色化や二光子吸収法に代表される非線形過程の利用、そして近年ではニアフィールド顕微鏡とい

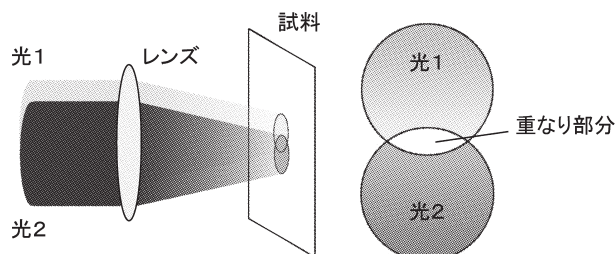


図1 二波長分光法を利用した超解像原理. 2色の重なり部分の大きさは回折限界よりもはるかに小さい.

った多くの方法が報告されている^{7,8)}. われわれは, 赤外超解像を達成する手段として, 2色の光を用いた二波長分光法と, レーザー蛍光顕微鏡を融合することで回折限界を突破する二波長超解像顕微鏡法^{9,10)}を選択した. 図1にこの手法における超解像原理を示す. まず, 2色の光を空間的にわずかにずらして試料に照射した場合を考える. このとき, それぞれの光は回折限界以下には集光できないが, 2色の重なり部分は回折限界以下の大きさになることは容易に理解できるであろう. したがって, この2色の重なり部分をレーザー制御することで蛍光消光あるいは蛍光増強による信号として取り出すことができれば, 回折限界以下の空間分解能を有する超解像顕微鏡が達成される (二波長超解像顕微鏡法). この顕微鏡法は, 通常の光学顕微鏡, すなわちファースフィールド顕微鏡の利点を生かしたまま空間分解能を高めるものであり, 1) *in situ* の観測が可能である, 2) 共焦点光学系による物体内部の三次元断層像の観察が可能である, 3) 機械的プローブを用いる必要がない, 4) ナノスケールの空間分解能を有するため, 生きたままの細胞内部を観察することも可能なすぐれた手法といえよう. 事実, 二波長超解像顕微鏡法のうちのひとつである STED 顕微鏡を用いてきわめて高い空間分解能で生体試料を観察した Betzig らの研究¹¹⁾は, *Science* 誌の Breakthrough of the year 2006 の Top 10 に選ばれたことからもうかがえるように, 光の回折限界を突破する“超解像”で生体試料・生命現象を観察する試みは科学者・生物学者の間で大いに注目を集めているホットトピックスである. 本稿で紹介する赤外超解像顕微鏡法は, この手法を赤外光と可視光の2色を用いて赤外波長領域まで拡張したものである.

2. 赤外超解像顕微鏡法

赤外超解像は, 赤外光と可視光を用いた二波長分光法である過渡蛍光検出赤外分光法^{12,13)}をレーザー蛍光顕微鏡へ応用することによって達成される. 過渡蛍光検出赤外分光

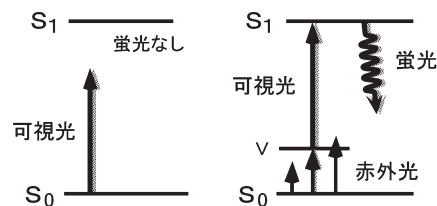


図2 過渡蛍光検出赤外分光法. 赤外光によって振動励起された分子のみが選択的に S_1 状態へ電子励起されることにより蛍光が観測される (右図). 可視光や赤外光のみの場合 (左図), あるいは赤外光が分子振動に共鳴しない場合は, 蛍光が観測されないゼロバックグラウンド検出法であるためきわめて高感度である.

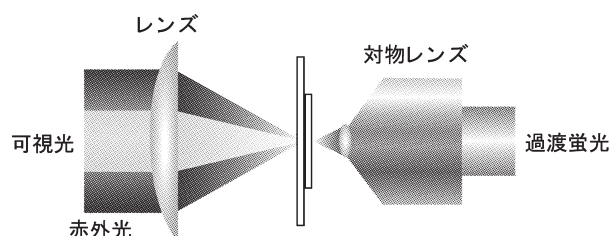


図3 検出系レイアウト. 赤外光および可視光は照明光として利用される.

法 (図2) は, 従来, 振動緩和の研究手段として用いられているものであり, 第1の赤外レーザー光によって, 特定の振動に赤外励起した分子を第2の可視レーザー光により選択的に電子励起することによって生じる S_1 状態からの可視蛍光 (過渡蛍光) を検出する分光法である. この分光法は, 可視光や赤外光のみの場合, あるいは赤外光が分子振動に共鳴しない場合は蛍光が観測されないゼロバックグラウンド検出法であるため, きわめて高感度である. これを顕微鏡法に適用した場合, 2つの方法で赤外超解像が達成できる. 1つは, 過渡蛍光が赤外光と可視光の重なり部分でのみ発生することを利用して蛍光発生領域を限りなく小さくしていく方法であり, 前述のとおりである (図1参照). もう1つは, 過渡蛍光検出赤外分光法の重要な特徴である赤外吸収を可視蛍光に変換して信号検出することを利用して, 検出系の工夫により赤外に対して超解像化を行う方法である. 具体的な検出系レイアウトを図3に示す. 赤外光と可視光は, 同軸から焦点距離 100 mm 程度の CaF_2 レンズで, いずれも $100\text{ }\mu\text{m}\phi$ 程度の大きさに調節して試料部全面へ照射される. 赤外光と可視光の重なり部分からは過渡蛍光が発生する. 発生した過渡蛍光は対物レンズを用いて背面から集められ, さらにレンズで ICCD へ結像される. この検出系レイアウトでは, 可視光および赤外光は単なる照明光として用いられているため, 空間分解能は過渡蛍光の波長と対物レンズの NA (開口数) で一

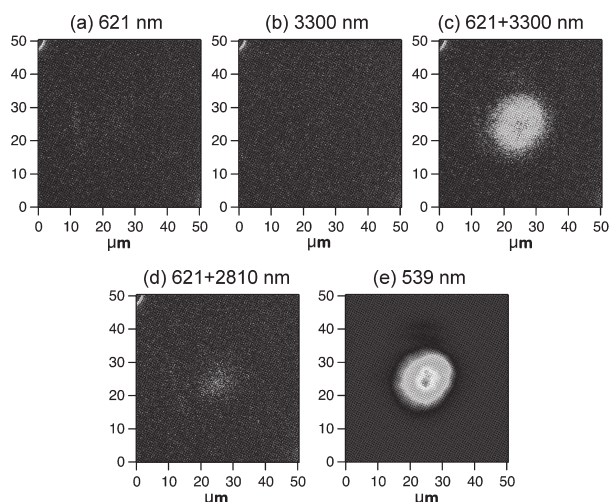


図4 赤外超解像顕微鏡法の微小試料への適用。試料にはローダミン6Gをドーブした $15\mu\text{m}$ 径蛍光ビーズを使用。(a)可視光のみ、(b)赤外光のみを入射した場合は蛍光は全く観測されないが、(c)可視光と赤外光を同時入射した場合には過渡蛍光像が明瞭に観測されている。(d)ローダミン6G分子の赤外吸収がほとんどない赤外波長では過渡蛍光像は消失する。(e)539nmの光を用いて測定した一光子励起の蛍光像である。

意に決まる回折限界に相当する。過渡蛍光は可視発光なので、赤外の振動情報を可視の回折限界に匹敵する空間分解能で観測することが可能となる。この方法を用いた場合は、共焦点光学系を組めないため三次元断層像を測定するのは困難である、試料細胞の薄片化が必要である、といった欠点もある。その一方で、対物レンズの視野領域全体を非走査で同時検出画像化することが可能なため、走査型の測定に比べてはるかに短時間で画像化を行うことができる。これは、光に対して敏感な生体試料や細胞を観察する際にはきわめて有効である。後述の微小試料/細胞の観察には、すべてこの検出系レイアウトを用いた。

3. 蛍光ビーズによる赤外超解像の検証

まずは、微小試料である蛍光ビーズを用いて赤外超解像顕微鏡法の原理検証実験を行った結果を図4に示す。試料にはローダミン6Gをドーブした $15\mu\text{m}$ 径の蛍光ビーズを用い、試料からの発光は $NA=0.35$ の対物レンズで集光した。比較のために、539nmの光を用いて測定した一光子励起の蛍光像も(e)に示す。(a)可視光(波長:621nm)のみ、あるいは(b)赤外光(波長:3300nm)のみを入射した場合には蛍光は全く観測されないが、(c)可視光と赤外光を同時入射した場合には、過渡蛍光像が明瞭に観測されている。過渡蛍光像がドーブしたローダミン6G分子の赤外吸収に依存するかどうかを確認するために、赤外

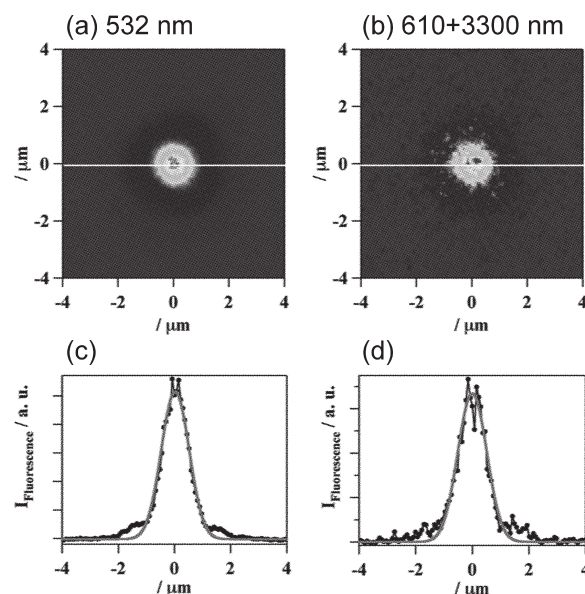


図5 空間分解能の検証。(a)の一光子励起の蛍光像と(b)の過渡蛍光像の空間分解能は(c)および(d)のフィッティングより、それぞれ、 $1.06\mu\text{m}$ および $1.10\mu\text{m}$ と算出された。過渡蛍光像は蛍光像とほぼ同じ空間分解能で、かつ、測定に用いた赤外波長における回折限界($4.0\mu\text{m}$)よりもはるかに高分解能、すなわち赤外超解像である。

光の波長をローダミン6G分子の赤外吸収がほとんどない2810nmに変えたところ、蛍光がほとんど消失した(図4(d)参照)。これより、過渡蛍光はローダミン6G分子の赤外吸収に依存する信号であることがわかる。さらに、赤外光と可視光の遅延時間を変えて測定したところ、赤外光を時間的に先に入射した場合のみ信号が生じ、可視光を先に入射した場合は蛍光が消失した。以上の事実から、観測された蛍光像は赤外振動励起準位を経由する赤外-可視の二重共鳴信号であることは明白である。また、空間分解能に着目すると、(c)の過渡蛍光像は539nmの光を用いて測定した一光子励起の蛍光像(e)と比べてもほとんど違いはみられなかったことから、過渡蛍光像(すなわち、赤外像)が可視の回折限界に近い高い空間分解能で観測されており、赤外に対して超解像を達成していると結論した⁵⁾。

この赤外超解像顕微鏡法を用いた場合にどれくらい高い空間分解能が得られるかを $1\mu\text{m}$ 径の蛍光ビーズを用いて検証した。結果を図5に示す。蛍光は $NA=0.5$ の対物レンズで集光した。図5(a)は532nmの光を用いて測定した一光子励起の蛍光像である。これは通常のレーザー蛍光顕微鏡と全く同じ測定を行ったものであり、およそ $1\mu\text{m}$ 径の蛍光像が観測されている。(b)に赤外超解像顕微鏡法を適用した結果を示す。可視光および赤外光はそれぞれ610nm、3300nmを用いた。図5(c)および(d)は、(a)

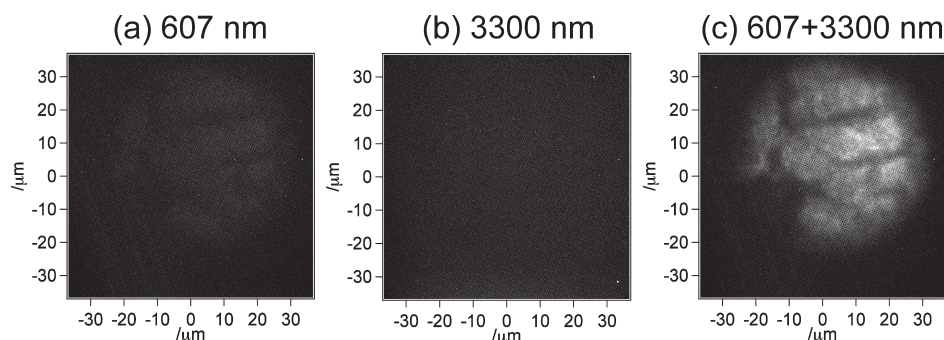


図6 赤外超解像顕微鏡法の細胞への適用。試料にはシロイヌナズナの根毛細胞を使用。可視光と赤外光を同時入射した場合では明瞭に細胞像が観測されている。

および (b) の白線部分の蛍光像の強度の実測結果 (●) とフィッティングにより空間分解能を算出した結果 (灰色実線) をそれぞれ示してある。両者とも強度のフィッティング結果は実測値とよく一致しており、一光子励起の蛍光像と赤外超解像像はいずれも $1.1\ \mu\text{m}$ と全く同じ空間分解能で観測されていることがわかった。この値は、過渡蛍光波長における回折限界にほぼ匹敵する分解能であり、過渡蛍光像の空間分解能が可視光によって決まり、赤外光の影響はほとんどないことを意味している。加えて、 $1.1\ \mu\text{m}$ の空間分解能は、測定に用いた赤外波長における回折限界 ($4.0\ \mu\text{m}$) よりもはるかに高分解能である。すなわち、過渡蛍光像は赤外光の回折限界を突破した赤外超解像像であることが明らかになった。

以上の実験により、われわれの開発した赤外ファーフールド超解像顕微鏡法が微小試料に対してきわめて有効であり、赤外超解像顕微鏡として機能することが検証できた。次章では、細胞への適用例を示す。

4. 色素染色した細胞への適用

研究対象としての究極の目標は、生きたままの細胞内部の構造や機能を分子レベルでリアルタイム観察することである。よって、赤外超解像顕微鏡法が細胞へも適用可能であるかどうかはきわめて重要な要素である。図6に、赤外超解像顕微鏡法をローダミン6Gで染色したシロイヌナズナの根毛細胞へ適用した結果を示す。試料は、発芽直後の種子をローダミン6Gで染色後、塩酸処理により薄片化してプレパラート化して用い、発光は $NA=0.25$ の対物レンズで集光した。このとき、蛍光波長領域 ($570\ \text{nm}$) における空間分解能は $1.4\ \mu\text{m}$ である。(a) 可視光 ($607\ \text{nm}$) のみ、あるいは (b) 赤外光 ($3300\ \text{nm}$) のみを入射した場合では蛍光は全く観測されないが、(c) 両者 ($607+3300\ \text{nm}$) を同時入射した場合では過渡蛍光像が明瞭に観測さ

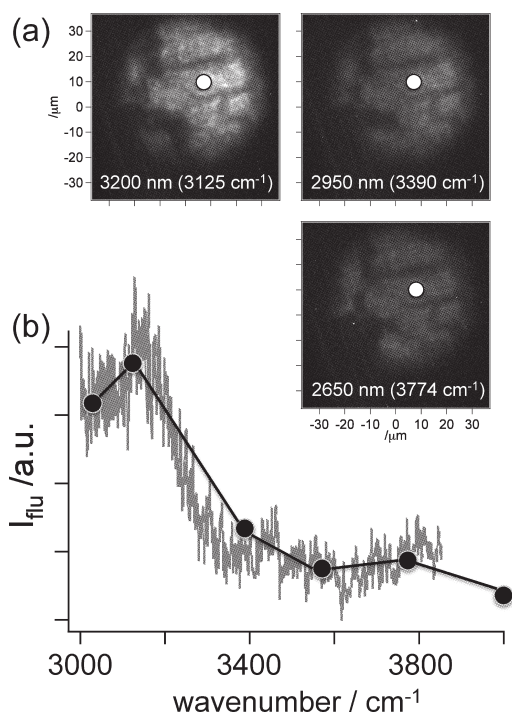


図7 過渡蛍光像の赤外波長依存性。(a) 過渡蛍光像の赤外波長依存性。(b) ○印部分 ($2\ \mu\text{m}$ 角の大きさ) の過渡蛍光強度の赤外波長依存性。プロットは重ねて図示したローダミン6Gの赤外スペクトルと一致している。(a), (b) の結果から、きわめて高い空間分解能で特定の赤外吸収の空間分布のマッピングおよび細胞内部の特定部位における赤外スペクトル測定が可能であることがわかる。

れている。これは、実際には、染色試料であるローダミン6Gの赤外吸収に共鳴して観測されたものであり、細胞自身の赤外吸収と対応しているものではない。しかしながら、赤外超解像顕微鏡法が細胞へも適用可能であることを示す結果であり、きわめて重要である。

次に、さまざまな赤外波長において過渡蛍光像の観測を行った。図7(a)に種々の赤外波長における過渡蛍光像を示す。赤外波長によって過渡蛍光像の蛍光強度に明瞭な違

いが観測されている。そこで、過渡蛍光像中の○印の部分(2 μm 角の領域を抽出)における赤外波長に対する過渡蛍光の強度変化をプロット(●)した(図7(b))。図中には強度変化のプロットとあわせて、可視光に621 nmを用いて赤外光を波長掃引して得られたクロロホルム- d_1 溶液でのローダミン6G分子の過渡蛍光検出赤外スペクトル(赤外吸収スペクトルに相当)を示している。両者は非常に一致を示していることから、過渡蛍光像の強度変化のプロットは、細胞内部の○印の部分に染色したローダミン6G由来の赤外吸収スペクトルに相当すると考えられる。また、染色試料であるローダミン6G由来の赤外情報を観測しているだけだが、これらの結果は、すでに2 μm 以下(将来的にはサブミクロンの大きさ)のきわめて高い空間分解能で特定の赤外吸収の空間分布マッピングおよび細胞内部の特定部位における赤外スペクトル測定が可能であることを示すものである。このように、赤外振動ラベルされた微小領域を可視の空間分解能で空間選択することができれば、細胞内部の形状や位置に関する情報を得るだけでなく、構造や機能を赤外分光に基づいて分子レベルで議論することも実現可能となるため、大変意義深い。

本稿では、二波長分光法のひとつである過渡蛍光検出赤外分光法を顕微鏡技術に応用した新規な赤外超解像顕微鏡について、超解像イメージングを中心に紹介してきた。この赤外超解像顕微鏡法では、赤外吸収を可視蛍光に変換して検出するため、空間分解能に関しては、一般の光学顕微鏡と同等である。本稿で示したとおり、1 μm 径の蛍光ビームを用いた検証実験でも、可視光の波長領域での回折限界にほぼ匹敵する高分解能(もちろん、赤外光に対しては超解像となる)で赤外像を観測できることを証明した。また、本稿では、この高い空間分解能を最大限に生かして、細胞観察はもちろんのこと、特定の赤外吸収の空間分布マッピング(すなわち、赤外イメージング)および細胞内部の特定の部位における赤外スペクトル測定も可能であることを示した。従来の赤外顕微鏡は、光学顕微鏡としては劣悪な空間分解能(10 μm 程度)のため、生体組織の観察しきれず細胞観察は不可能だったことを考えると、革命的な進歩といえよう。

また、本稿では割愛したが、赤外超解像顕微鏡法は、超解像化のほかにも振動緩和現象の観測も可能である。これは、過渡蛍光検出赤外分光法が、本来、振動緩和の研究に用いられるピコ秒時間分解分光法であり、赤外光と可視光の遅延時間の関数として振動緩和ダイナミックスを観測できるからである。この特徴は、顕微鏡技術に応用されても

全く損なわれることはない。事実、われわれはすでに、細胞内部のローダミン6Gの振動緩和ダイナミックスの観測に成功しており、細胞内部では、50ピコ秒以上の時間が経過してもローダミン6G分子から振動エネルギーが散逸しない特異な振動緩和現象を新たに見いだした¹⁴⁾。この現象の機構解明は現在進行中であるが、赤外超解像顕微鏡法を利用することで、細胞内部のピコ秒時間領域でのダイナミックス観測も実現可能なのである。

以上のように、赤外振動ラベルされた微小領域を可視の空間分解能で空間選択できる赤外超解像顕微鏡法は、赤外分光の利点を生かして細胞内部の構造や機能を分子レベルで観察するだけでなく、ピコ秒時間分解分光の利点を生かして細胞内ダイナミックスさえも可視化するポテンシャルを秘めており、ナノスケール時代の新たな顕微鏡法として今後大いに期待される。

本研究は科学研究費補助金(特定領域研究「分子高次機能解明のための分子科学—先端計測法の開拓による素過程的理解」)および先端計測分析技術・機器開発事業(要素技術プログラム「高感度・高密度バイオ光受容素子」)の支援により行われた。

文 献

- 1) L. H. Kidder, A. S. Haka and E. N. Lewis: *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (John Wiley and Sons, Chichester, 2002).
- 2) K. L. A. Chan and S. G. Kazarian: "New opportunities in micro- and macro-attenuated total reflection infrared spectroscopic imaging: Spatial resolution and sampling versatility," *Appl. Spectrosc.*, **57** (2003) 381-389.
- 3) K. Yano, S. Ohoshima, Y. Gotou, K. Kumaido, T. Moriguchi and H. Katayama: "Direct measurement of human lung cancerous and noncancerous tissues by Fourier transform infrared microscopy: Can an infrared microscope be used as a clinical tool?" *Anal. Biochem.*, **287** (2000) 218-225.
- 4) L. H. Kidder, V. F. Kalasinsky, J. L. Luke, I. W. Levin and E. N. Lewis: "Visualization of silicone gel in human breast tissue using new infrared imaging spectroscopy," *Nat. Med.*, **3** (1997) 235-237.
- 5) M. Sakai, Y. Kawashima, A. Takeda, T. Ohmori and M. Fujii: "Far-field infrared super-resolution microscopy using picosecond time-resolved transient fluorescence detected IR spectroscopy," *Chem. Phys. Lett.*, **439** (2007) 171-176.
- 6) M. Sakai, T. Ohmori and M. Fujii: "Two-color picosecond time-resolved infrared super-resolution microscopy," *Nano Biophotonics*, eds. H. Masuhara, S. Kawata and F. Tokunaga (Elsevier, Oxford, 2007) pp. 189-195.
- 7) 河田 聡編: 超解像の光学(学会出版センター, 1999).
- 8) 藤田哲也監修: 新しい光学顕微鏡(学際企画, 1995).
- 9) T. Watanabe, Y. Iketaki, T. Omatsu, K. Yamamoto, M. Sakai and M. Fujii: "Two-point-separation in super-resolution fluorescence microscope based on up-conversion fluorescence depletion technique," *Opt. Express*, **11** (2003) 3271-3276.

- 10) K. I. Willig, S. O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn and S. W. Hell: "STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis," *Nature*, **440** (2006) 935-939.
- 11) E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz and H. F. Hess: "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution," *Science*, **313** (2006) 1642-1645.
- 12) A. Seilmeier, W. Kaiser, A. Laubereau and S. F. Fischer: "A novel spectroscopy using ultrafast two-pulse excitation of large polyatomic molecules," *Chem. Phys. Lett.*, **58** (1978) 225-229.
- 13) M. Sakai and M. Fujii: "Vibrational energy relaxation of the 7-azaindole dimer in CCl₄ solution studied by picosecond time-resolved transient fluorescence detected IR spectroscopy," *Chem. Phys. Lett.*, **396** (2004) 298-302.
- 14) M. Sakai, T. Ohmori, M. Kinjo, N. Ohta and M. Fujii: "Picosecond time-resolved infrared imaging by a non-scanning two-color infrared super-resolution microscope," *Chem. Lett.*, **36** (2007) 1380-1381.

(2009 年 2 月 13 日受理)