アンチストークス蛍光を用いた多色蛍光顕微鏡法

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 齋藤, 究 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/35698

実験技術

アンチストークス蛍光を用いた多色蛍光顕微鏡法

金沢大学理学部物理学科　齋藤　究

1．はじめに

励起光よりも長波長側に放出される蛍光をストークス（Stokes）蛍光といい，短波長側に放出される蛍光をアンチストークス（anti-Stokes）蛍光という．通常の蛍光顕微鏡法で検出される蛍光は前者である．生物物理の分野に限らず，蛍光顕微鏡法は細胞レベルから分子レベルまで，さまざまな情報を得る上で非常に重要な手法となっている．蛍光強度，偏光，スペクトルの変化など得られる情報の種類も多い．複数の染色対象から情報を得るために，2種類以上の蛍光色素で標識する多重観察も行われている．アンチストークス蛍光を用いれば，波長の範囲をさらに広げることができ，情報量を増やすことが可能である．本稿では，光学部品や色素の選択など，アンチストークス蛍光を観察する上でのコツについてまとめた．Nd:YAGレーザーで励起したBODIPY FLのアンチストークス蛍光とテトラメチルローダミンのストークス蛍光の同時観察例を紹介する[1)]．

2．原理

蛍光色素における光の吸収と発光は分子のエネルギー状態と密接な関係にある（**図1**）．左側のストークス蛍光についてまず述べよう．一重項の基底状態S_0にある電子が光によって励起され，第一励起状態S_1に遷移する．一重項のエネルギーレベルはさらに振動レベルによって細かく分かれている．S_1に遷移した電子はその中の最低次の振動レベルまで分子内緩和により遷移したあと，蛍光の放出を伴ってS_0に遷移する．このサイクルでは，S_1滞在中，分子内緩和によってエネルギーが減少する．励起光と放出される蛍光の光子エネルギーは，プランク定数hと各々の光子の振動数ν_{ex}, ν_{em}を使って$h\nu_{ex}$, $h\nu_{em}$と書けるので，$\nu_{ex} > \nu_{em}$となる．波長で考えれば$\lambda_{ex} < \lambda_{em}$となり，放出される蛍光は励起光よりも長波長側のストークス蛍光となる（**図1**，黒矢印）．

一方，アンチストークス蛍光が発生するメカニズムはどうなっているのだろうか？S_0のなかで，最低レベルよりも高い振動レベルにある電子がS_1に励起され，励起される前よりも低い振動レベルに遷移すれば，励起光よりも大きなエネルギーをもった蛍光が放出される（**図1**，白矢印）．実際にそのようなことが可能であろうか．蛍光色素BODIPY FLを波長532 nmのNd:YAGレーザーで励起し，510 nmのアンチストークス蛍光を観察する例を考えてみる．簡単のため，温度を300 Kとし，ボルツマン定数k_Bを使ったエネルギーの単位k_BT（4.1×10^{-21} J）で考える．波長532 nmおよび510 nmの光子のもつエネルギー$h\nu$はそれぞれ90 k_BTと94 k_BTで，このエネルギー差ΔEは4 k_BTとなる．蛍光色素分子は周囲の環境と熱平衡状態にある．全蛍光色素分子のなかで基底状態よりもΔEだけよけいにエネルギーを持つ分子の割合は$\exp(-\Delta E / k_BT) = 0.018$となる．このような分子が励起された後にアンチストークス蛍光を放出することは十分現実的である．ΔEが小さい，つまり，励起光とアンチストークス蛍光の波長差が小さいほど条件を満たす分子の割合が増加するので蛍光発生の効率はよくなる．

アンチストークス蛍光の発生効率は低いので，同じ色素のストークス蛍光に比べ，アンチストークス蛍光の強度は小さい．励起光強度が不足するときにはエバネッセント場の増強効果を利用してそれを補うことも可能である．高屈折率の媒質（例えばガラス）から低屈折率の媒質（例えば水）に光が進入したとき，入射角が臨界

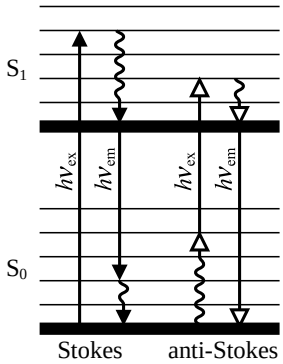

図1　ストークス蛍光（黒矢印）とアンチストークス蛍光（白矢印）発生時における電子のエネルギー準位遷移
直線は光の吸収（$h\nu_{ex}$）と発光（$h\nu_{em}$）を伴う遷移，波線は熱エネルギーのやりとりによる遷移．

Dual-Color Microscopy Using Anti-Stokes Fluorescence

Kiwamu SAITO
Department of Physics, Faculty of Science, Kanazawa University

角よりも大きいと光は全反射して低屈折率の媒質側には進行していかないが，境界面から100 nm程度の浅い領域に定在する電磁場が発生する．この電磁場をエバネッセント場と呼ぶ[2]．エバネッセント場も伝搬波と同様に蛍光色素を励起できる．蛍光照明の背景光を減少させる効果があるので，水溶液中で蛍光色素1分子を観察する方法として有効である[3)-5)]．エバネッセント場強度は，入射角が臨界角に近いとき入射強度よりも増強される[2]．入射角，媒質の屈折率，偏光方向に依存するが，市販スライドガラス（屈折率1.52）と水（屈折率1.33）の場合，臨界角近傍では4から5倍の増強効果が得られる．

3．実験

3.1　光学系

蛍光顕微鏡法では，励起光の排除が重要であるが，今の場合，励起光と観察するアンチストークス蛍光の波長差が小さいので，排除する励起光の帯域はできるだけ狭いほうがよい．そこで，アーク放電を使う水銀ランプやキセノンランプのように波長帯域の広い光源ではなく，単色性のよいレーザーを使用する．

通常の蛍光観察で励起光の排除に用いられる市販のダイクロイックミラーも，ここでは使用できない．それらは励起光よりも長波長側を透過するように設計されているが，短波長側は特に考慮されていないからである．**図**2に特注したダイクロイックミラー（朝日分光）の分光特性を示す．ストークス蛍光も同時に観察するため，532 nmのレーザーを反射し，可視光領域を透過するような設計にした．

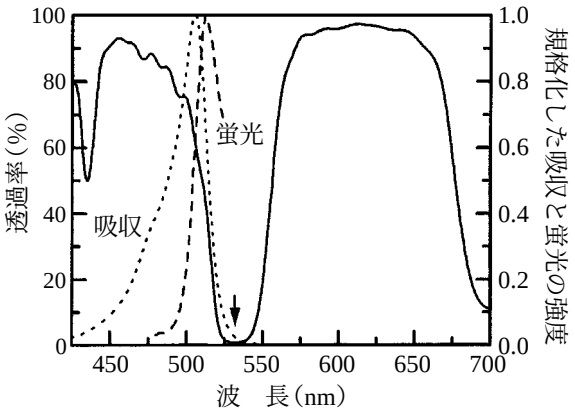

図2　蛍光色素BODIPY FLファラシジンの吸収，蛍光スペクトルとダイクロイックミラーの透過率
実線は532 nm（矢印）のNd:YAGレーザー用に設計したダイクロイックミラーの透過率．点線と破線はそれぞれ吸収スペクトルと532 nmで励起したときの蛍光スペクトル．ピーク値で規格化してある．

対物レンズから戻ってきた後，ダイクロイックミラーを透過してくるレーザーは蛍光色素に適したバンドパスフィルターで取り除いた．BODIPY FLにはOmega Optical社製の510DF23（透過波長：499～521 nm）を，ローダミンやCy3には590DF60（透過波長：560～620 nm）を使用した．レーザーを選択的に取り除くノッチフィルター（Kaiser Optical System社，HNPF-532AR）を使えば，BODIPY FLからのアンチストークス蛍光とローダミンやCy3のストークス蛍光を同時に1台のカメラで検出することも可能である．

3.2　蛍光色素

励起（吸収）スペクトルと蛍光スペクトルの重なりの大きい蛍光色素がアンチストークス蛍光の観察に適している．励起光と蛍光観察の波長が通常の蛍光顕微鏡法とは逆転するので，観察する波長領域よりも長波長側まで励起スペクトルが広がっている必要がある．アンチストークス蛍光の観察ではレーザーによる励起が必要だが，使用できるレーザーの波長よりも短波長側に励起および蛍光スペクトルの極大がある色素を選ぶ．532 nmのレーザーで励起する場合，フルオレセイン（λ_{ex}（max）＝496 nm, λ_{em}（max）＝516 nm）とBODIPY

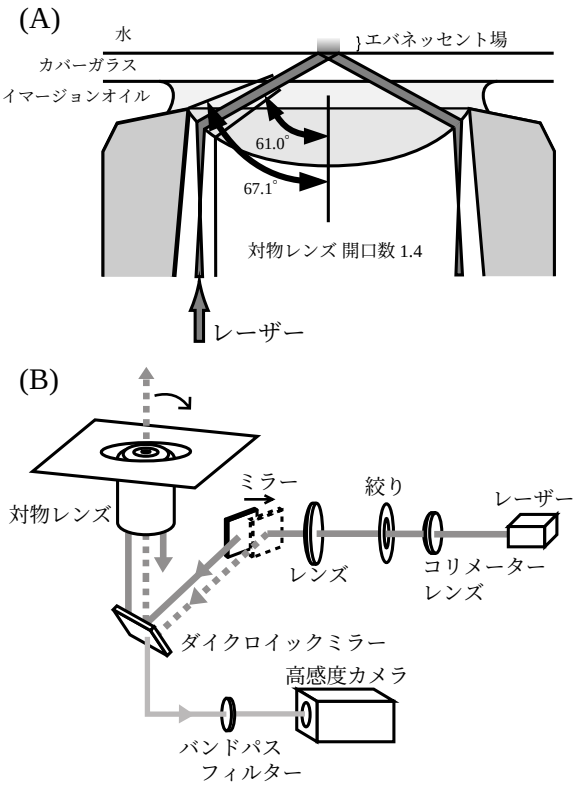

図3　対物レンズ型エバネッセント場照明
（A）開口数1.4の無限遠補正系対物レンズを使ってエバネッセント場を発生させる方法．（B）顕微鏡概略．

FL（λ_{ex}(max)＝503 nm, λ_{em}(max)＝512 nm）を使った観察が可能であった.

3.3 顕微鏡

本顕微鏡は BODIPY FL で標識したアクチンフィラメントだけでなく, 1分子の蛍光色素Cy3で標識したミオシンS1との同時観察を目的としているため, 対物レンズ型の全反射照明顕微鏡[4]となっている（**図3(A)**）. 開口数NA＝1.4の対物レンズの場合, ガラスの屈折率n＝1.52から計算される開口角θは, $NA = n\sin\theta$ より 67.1°である. この角度は水の屈折率1.33を使って計算した臨界角61.0°よりも大きいので, レーザーの入射角によってはカバーガラスと溶媒の境界面で全反射し, エバネッセント場を形成する. **図3**(B) に顕微鏡の全体図を示す. ダイクロイックミラーの直前に置いたミラーを移動させることにより, 通常の落射照明と全反射照明を簡単に切り替えることができるようになっている[4]. 観察はイメージインテンシファイアー（浜松ホトニクス, C2400-87）とSITカメラ（浜松ホトニクス, C2400-08）の組み合わせを使用した.

4. 2重標識試料の観察

図4に2重標識同時観察の例を示す[1]. **図4**(A) はアクチンフィラメントに特異的に結合するBODIPY FL ファラシジンを使ってラベルしたアクチンフィラメント2本のアンチストークス像である. この画像は背景光が少い. 背景光の原因として, ラマン散乱や埃の蛍光などがあげられるが, これらはおもに励起光よりも長波長側に発生するからである. この像はエバネッセント場照明によるが, ケラー照明にしてもアクチン像は観察できた. **図4**(B) はテトラメチルローダミン1分子で標識したミオシンS1の像である. ミオシンS1はアクチンフィラメントに結合しているので, 右側のアクチンフィラメントに対応する場所に輝点が見える.

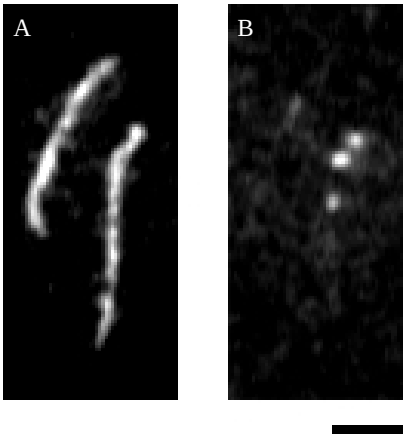

図4　2重蛍光標識試料の蛍光像
(A) BODIPY FL ファラシジン標識アクチンフィラメント. (B) テトラメチルローダミン1分子で標識したミオシンS1. アクチンフィラメントに結合している. スケールバーは5 μm

5. おわりに

多色蛍光観察法を使えば, 2種類の物質に着目してそれらの振る舞いを画像化したり計測したりすることができる. さらに, 観察する波長を増やせば, 得られる情報も増加する. 3重, 4重標識用のダイクロイックミラーも市販されている. 本稿ではBODIPY FL のアンチストークス蛍光とローダミンのストークス蛍光を使った2重蛍光観察の例を示した. ローダミンよりも長波長側の色素, たとえば Cy5（λ_{ex}(max)＝648 nm, λ_{em}(max)＝665 nm）を使用すれば, BODIPY FL, ローダミン, Cy5の3重観察が, 1波長の励起だけで可能である. 蛍光顕微鏡法でもう1色欲しいとき, 本稿で紹介したアンチストークス蛍光を考慮してはどうだろうか.

また, 多重蛍光観察を行いたいのだが, 適した官能基をもつ蛍光色素が見つからないとか, 使用できる蛍光プローブや励起波長がもう決まっているなど, システムの自由度が制限されているときもアンチストークス蛍光を候補にあげて欲しい. 本稿で紹介した同時画像化は1分子イメージングに適した色素, ローダミンやCy3と同時にアクチンフィラメントを画像化したいという要求から始まった. アクチンフィラメントに結合するファラシジンと結合したBODIPY FLがすでに市販されていたのである. 本稿であげた色素とレーザーの組み合わせ以外でも画像化できるアンチストークス蛍光がないかどうか, ぜひ試していただきたい.

文 献

1) Saito, K., Tokunaga, M., Iwane, A.H. and Yanagida, T.（1997）*J. Microsc.*, **188**, 255-263.
2) Axelrod, D.（1989）*Methods in Cell Biol.*, **30**, 245-270
3) Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K. and Yanagida, T.（1995）*Nature*, **374**, 555-559.
4) Tokunaga, M., Kitamura, K., Saito, K., Iwane, A.H. and Yanagida, T.（1997）*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 47-53.
5) 齋藤 究, 船津高志（1999）蛋白質 核酸 酵素, **44**, 807-811.