

研究テーマ 「最新型微弱光検出器による生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出」

研究責任者	所属機関名	光産業創成大学院大学		
	官職又は役職	准教授		
	氏名	横田 浩章	メールアドレス	yokota@gpi.ac.jp
共同研究者	所属機関名	浜松ホトニクス株式会社 電子管事業部		
	官職又は役職	主査		
	氏名	深澤 宏仁		

(平成 28 年度募集) 第 29 回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要

生命科学の研究現場において生体分子を生きのままイメージングできる蛍光顕微鏡はなくてはならないツールとなっている。とりわけ、蛍光標識した生体分子 1 分子を実時間で直視できる蛍光 1 分子検出技術は、個々の生体分子の運動・相互作用・構造変化などのダイナミクスを集団平均することなく実時間で観察できる強力な蛍光顕微鏡法である。

本研究では、最新型の微弱光検出器である光電子増倍管やハイブリッドフォトディテクタ (HPD)¹ を用いて、これまで報告のない、動いている生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出を達成するとともに、微弱光検出器の新たなライフサイエンス分野での用途を開拓し、ライフサイエンス分野用の高時間分解能蛍光検出システムの開発につなげることを目的とした。

平成 29 年度は、動いている生体分子 1 分子に標識した蛍光物質 1 個の高時間分解能定常蛍光検出を行ったほか、時間分解検出に必要なパルスレーザーや顕微鏡光学系部品を購入し、高時間分解能蛍光検出系を構築した。そして脂質二重膜を二次元自由拡散する脂質に標識した蛍光物質 1 個の HPD による蛍光寿命測定と高感度 CCD (時間分解能 33 ms) による蛍光強度と軌跡追跡の同時観察を行った。我々が知る限り動いている蛍光分子 1 分子の蛍光寿命を計測した初めての例である。本成果を『応用物理』2018 年 9 月号に発表した²。

平成 30 年度は、HPD を 1 台追加導入し、偏光ビームスプリッターやダイクロイックミラーなどを加えて蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出の系を構築した。そして構築した蛍光 2 色同時検出系を用いて、2 次元自由拡散を行う脂質分子に標識した 2 色の蛍光物質 1 個それぞれに対して 2 台の HPD による蛍光寿命測定と高感度 CCD

(時間分解能 33 ms) による蛍光強度と軌跡追跡の同時観察を行った。

また、最新型微弱光検出器を組み込んだライフサイエンス分野用の高時間分解能蛍光検出システムの新規開発として、複数の微弱光検出器を 1 台にまとめたマルチチャンネル微弱光検出器の開発に着手している³。マルチチャンネル化によって、複数パラメーターの同時取得が可能となり、生体分子のダイナミクスや関連する生命現象の生体分子間相互作用の機序により詳細に迫ることができる。蛍光顕微鏡に簡素に組み込めるようなマルチチャンネル微弱光検出器を開発すれば、ライフサイエンス分野用の高時間分解能蛍光検出システムとして実用化は目前であると考えている。

2. 実施内容および成果の説明

生体内で通常動き回って機能している生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出が、そのダイナミクスや関連する生命現象の生体分子間相互作用の機序を理解する上で重要であるにもかかわらず、光検出器の性能上の制約から、本研究開始当初、同一の動いている生体分子 1 分子の継続した高時間分解能蛍光検出の報告はなかった。

我々は最新型の微弱光検出器である電子増倍管 (PMT) やハイブリッドフォトディテクタ (HPD)¹ を用いて研究を行っている。これら最新型の微弱光検出器は、CCD なみの広い受

表 1: 蛍光検出器の特性比較

	最新型 微弱光検出器	高感度 CCD	APD
時間分解能	~100 ps	数 ms	~100 ps
有効受光面サイズ	~5 mm	~5 mm	数 100 μm
広視野高時間分解能 蛍光 1 分子検出	○	×	×

光面とアバランシェホトダイオード (APD) と同等の高い時間分解能をもつため、広視野高時間分解能蛍光 1 分子検出が可能である (表 1)。

本研究では、最新型の微弱光検出器であるハイブリッドフォトディテクタ (HPD) を用いて、これまで報告のない、動いている生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出を達成した。本研究では、サブ ms 時間分解能の定常蛍光検出のほか、時間分解検出に必要なパルスレーザーなどを組み込みサブ ns 時間分解能の蛍光寿命測定も行った。そして、微弱光検出器の新たなライフサイエンス分野での用途を開拓し、ライフサイエンス分野用の高時間分解能蛍光検出システムの開発につなげる。

(1)時間分解蛍光検出系の構築

時間分解蛍光検出に必要なパルスレーザーと、時間相関単一光子計数モジュールを、それぞれ顕微鏡と計測用 PC に導入し、高時間分解能蛍光検出系を構築した。本研究で用いる蛍光 1 分子顕微鏡の概要を図 1 に示す。

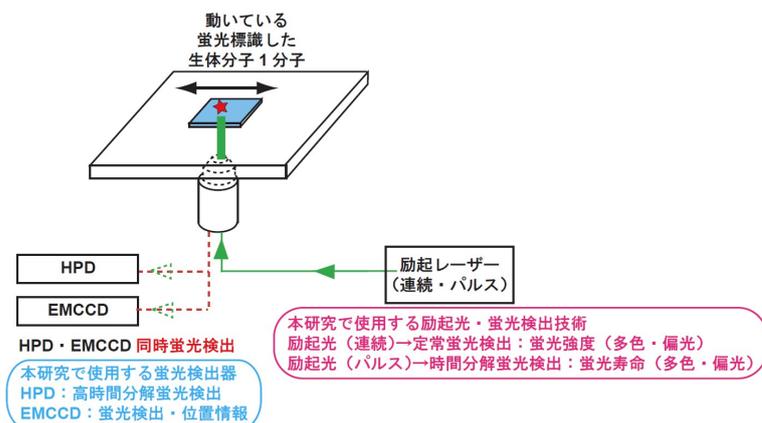


図 1：本研究で用いる蛍光 1 分子顕微鏡の概要。

(2)生体分子 1 分子に標識した蛍光分子 1 分子の時間分解蛍光検出

(2-1)2 次元自由拡散を行う Qdot 標識脂質分子の蛍光寿命測定 (図 2)

ビオチン-アビジン相互作用によって Qdot で蛍光標識した脂質について、その 2 次元自由拡散運動中の Qdot1 分子の時間分解蛍光検出を行った。HPD による蛍光寿命測定と EMCCD (時間分解能 33 ms) による蛍光強度と軌跡追跡の同時観察を行った (図 2)。本成果を『応用物理』2018 年 9 月号に発表した³。

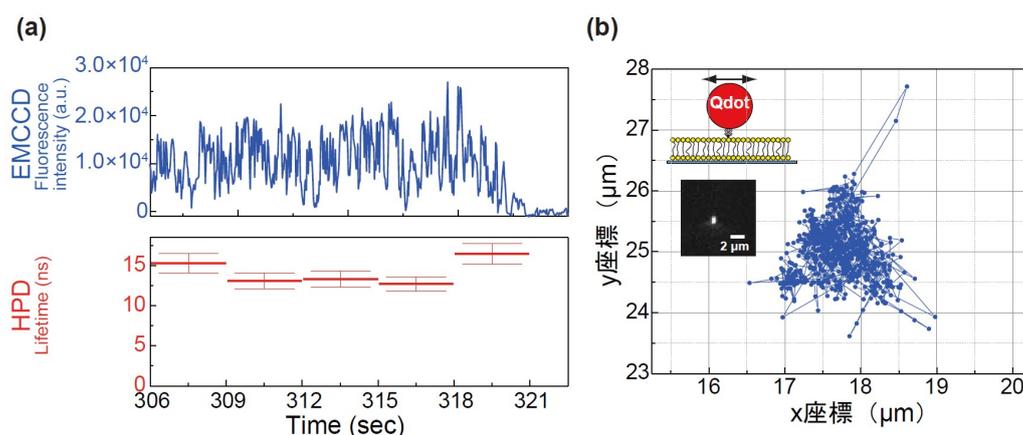


図 2：平面上を 2 次元自由拡散する Qdot 標識脂質分子の蛍光寿命測定 (3 秒ごと・320 秒付近で視野外に移動)。(a)上：蛍光強度変化 (EMCCD) .下：蛍光寿命の時間経過 (HPD)。(b)軌跡。

(3)蛍光分子 1 分子の時間分解蛍光検出による pH 変化の検出

生体分子は温度、溶媒、塩濃度、pH のような周囲の環境変化に応答してその機能を制御する。ここでは蛍光分子 1 分子の時間分解蛍光検出によって pH 変化が検出できることを実証した。

(3-1) pH 感受性蛍光色素標識 Qdot の蛍光寿命変化測定 (図 3)

pH 感受性の蛍光色素を Qdot 表面に標識し、Qdot を FRET のドナー、その蛍光色素を FRET のアクセプターと見立てて、pH 変化による Qdot1 個の蛍光寿命の変化を検出した。

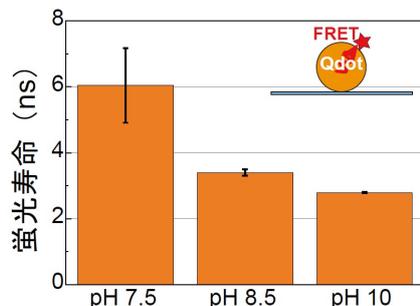


図 3 : pH 感受性蛍光色素を標識した Qdot1 分子の蛍光寿命測定.

(4) 蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出系の構築 (図 4)

HPD を 1 台追加導入し、偏光ビームスプリッターやダイクロイックミラーなどを加えて蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出の系に拡張した。こうすることで、2 色の蛍光の同時検出や、直交する 2 つの偏光成分に分けた蛍光の同時検出が可能となる。なお EMCCD による 2 成分同時検出はデュアルビュー光学系を用いる。デュアルビュー光学系では、分割した EMCCD の 2 つの視野に 2 成分の蛍光をそれぞれに割り当てるので 1 台の EMCCD で 2 成分同時検出が可能である。

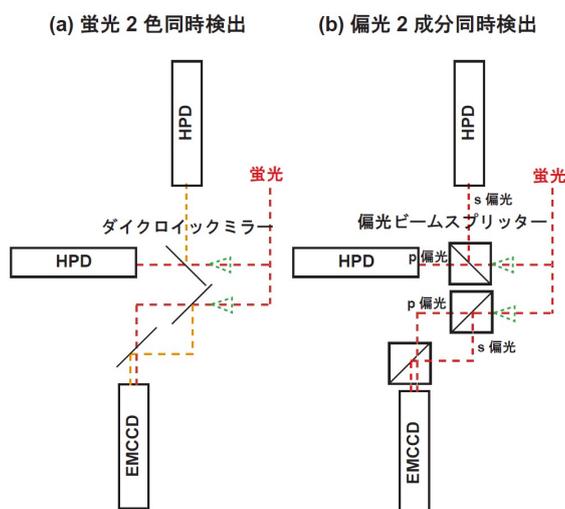


図 4 : 蛍光 2 色同時・偏光 2 成分同時検出系の模式図. (a) 蛍光 2 色同時検出系 (b) 偏光 2 成分同時検出系. EMCCD による 2 成分同時検出はデュアルビュー光学系を用いて、EMCCD 1 台の視野を 2 つに分割して行う。

(5) 蛍光 2 色同時検出系を用いた動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出・時間分解
蛍光検出

(5-1) 2 次元自由拡散を行う 2 色の Qdot 標識脂質分子の蛍光寿命同時測定 (図 5)

構築した蛍光 2 色同時検出系を用いて、2 次元自由拡散を行う脂質分子に標識した
Qdot585 と Qdot655 の定常蛍光検出と蛍光寿命測定の同時測定を行った。

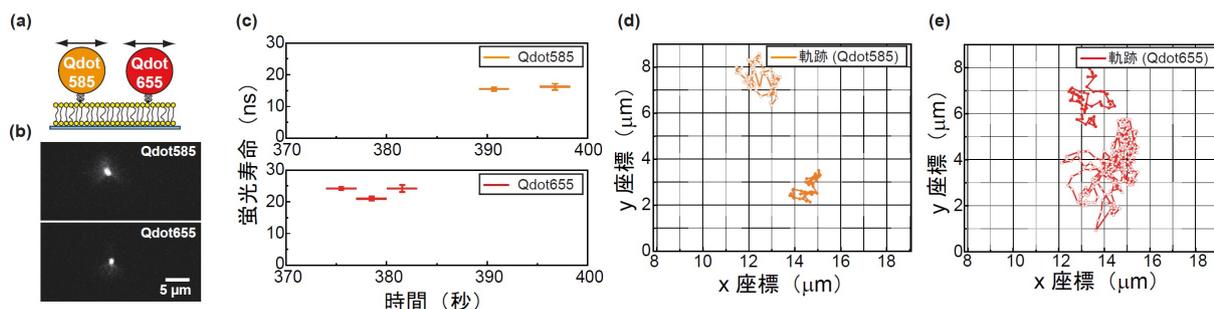


図 5 : 平面上を 2 次元自由拡散する Qdot 標識脂質分子に標識した Qdot585 と Qdot655 の
蛍光寿命同時測定 (3 秒ごと) . (a) 模式図 . (b) 蛍光像 (EMCCD (デュアルビュー光学
系)) . (c) 蛍光寿命の時間経過 (HPD) 上 : Qdot585 下 : Qdot655 . (d) Qdot585 の軌跡
(EMCCD) . (e) Qdot655 軌跡 (EMCCD) .

参考文献

1. Fukasawa, A., Hybrid Photodetectors (HPDs) for Single-Photon Detection. Semiconductor Radiation Detection Systems 151-170, Edited by Iniewski, K., CRC Press (2010).
2. Fukasawa, A., Egawa, Y., Ishizu, T., Kageyama, A., Kamiya, A., Muramatsu, T., Nakano, G., Negi, Y. Multichannel HPD for high-speed single photon counting. Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. A 812, 81-85 (2016).
3. 横田 浩章, 深澤宏仁 : ハイブリッドフォトディテクタ (HPD) のバイオ蛍光顕微鏡応用と広視野高時間分解能生体 1 分子蛍光検出, 応用物理 **87**, 670-673 (2018).