329 第2 高調波発生顕微鏡による生体内分子の3次元配向計測

Development of second-harmonic-generation microscope
to determine 3-dimensional molecular orientation
with 3-dimensional spatial resolution.

○ 正 吉木 啓介(阪大院基礎工) 正 橋本 守(阪大院基礎工)
正 荒木 勉 (阪大院基礎工)

Keisuke YOSHIKI, Osaka University, Machikaneyama-cho 1-3, Toyonaka, Osaka
Mamoru HASHIMOTO, Osaka University
Tsutomu ARAKI, Osaka University

Key words: Six-dimensional microscope, Second harmonic generation, Molecular orientation, Collagen

1. 緒言

我々は分子の位置と向きを計測できる顕微鏡として、6次元 SHG(第2 高調波発生)顕微鏡の開発を行っている。従来の顕微計測技術では主に対象分子がどこに、どのくらい存在するかといったスカラー場的な観測を行ってきたが、我々は分子がどこに、どちらに向いて存在するかといったベクトル場的観測を目指している。このような分子の向きを観測するためには、光電場の方向を制御することが必要となるが、顕微計測ではレーザー光を集光した状態で光電場の方向を制御しなければならない。そこで我々は、レーザービーム断面内の偏光・位相分布を任意に制御することで、このビームを集光した焦点での電場を制御した。また、この電場制御と非線形光学効果である SHG を組み合わせると高い3次元空間分解イメージングを両立させる⁽¹⁾。

この装置は再生組織を製造する際の品質評価に応用できる。軟骨、皮膚などの組織は産生したコラーゲンによって組織の機械的強度を担うが、コラーゲンは位置も向きも3次元の自由度をもっている。これらを正確に評価するためには6次元での観測を行う必要がある。また、SHGでは分子配列の規則正しさも評価でき、従来の顕微鏡では評価できなかったコラーゲン線維の特性も計測できる。

本稿では、これまで開発してきた6次元 SHG 顕微鏡による3次元分子配向計測の定量性を向上させるために、巨大リポソーム(GUV)を校正物質に用いて補正情報の取得を行い、生体内コラーゲンの3次元配向角度の計測に適用したので、その結果を報告する。

2. 6次元 SHG 顕微鏡

SHGは2次の非線形光学現象で、高強度の光入射により入射波長の半分の波長の光が発生する現象である。これは非中心対称構造を持つ分子が規則的に配列したときに発生する。また、配列の規則性が高いほど、特定の励起方向に対して強いSHGが発生する。このSHG光を信号光とした顕微鏡がSHG顕微鏡であり、SHGはレーザー集光時、その焦点付近に限局して発生するため奥行き方向に分解能を持つ。そのため、3次元走査を行うことにより3次元構築が可能である(3次元空間分解能)。我々はフェムト秒パルスレーザーを用いたSHG顕微鏡に偏光・位相変調器を設置することで6次元顕微鏡を構築した。

Fig. 1に開発した6次元 SHG 顕微鏡を示す。偏光・位相変調器は空間位相変調器(SLM)と2枚の1/4波長板から成り、この装置により、Fig. 2に示すように、直線偏光によって観測面内方向の電場(a)を、放射状の偏光分布を持つラジアル偏光によって奥行き方向の電場(b)を発生させる

Fig. 1 Experimental setup of six-dimensional microscope

Fig. 2 Electric field at focus of lineally polarized beam (a), and radially polarized beam (b).

ことができるため、焦点における電場方向を3次的に制御し、3次元の分子配向を計測することを可能とした(3次元配向計測)。3次元空間分解能に3次元配向計測を併せて6次元の観測を可能とした。

3. コラーゲン組織の3次元配向

6次元 SHG 顕微鏡を用いた生体組織の計測例として、ヒトアキレス腱コラーゲンの3次元配向観測を行った。コラーゲン分子の3重らせん構造は非中心対称性を持つため、線維方向に励起した時に強いSHGが発生する⁽²⁾。そのため、励起方向とSHG強度の関係から、コラーゲンの配向方向が

分かる．開発した 6 次元 SHG 顕微鏡を用いて，観測面内に配向した生体内コラーゲンと，奥行き方向に配向した生体内コラーゲンの測定を行った．

使用したサンプルはヒトアキレス腱の切片(10 μ m 厚)で，パラフィン包埋後，線維に対して水平方向と垂直方向に切片スライスし，脱パラ処理をして蒸留水中に封入を行った．これらのサンプルを，6 次元 SHG 顕微鏡で観測面内の 2 方向(x, y)，および奥行き方向(z)の 3 方向で励起したときの SHG イメージを Fig. 4 に示す．(a)～(c)は観測面内の x 方向に配向したサンプル，(d)～(f)の観測面に垂直な z 方向に配向したサンプルの SHG イメージである．(a)と(f)の SHG 強度が強いことから分かるように，コラーゲンの配向方向と励起方向が一致したとき強い SHG が発生していることが分かり，それぞれ，x 方向，z 方向に配向していることを示している．このように，これらの SHG 断層イメージを比較することで，3 次元的なコラーゲン配向を検出することが出来た．

4. リボソームの膜配向計測による校正

6 次元顕微鏡で 3 次元配向角度の計測を行うためには，前述の測定からさらに精度を上げる必要がある．そこで我々は GUV を基準材料とした校正法を試みた．6 次元顕微鏡は 3 次元方向の励起が可能であるが，観測面内方向の励起と奥行き方向励起では SHG 検出感度が異なるため，単純な各方向成分の比較では 3 次元配向角度を求めることは出来ない．正確な 3 次元配向計測を行うために，分子配向方向が既知であるサンプルによる SHG 検出強度の校正が必要となり，我々は GUV を基準材料とした校正法を試みた．

Fig. 3 に示すように，SHG を発生し，かつリン脂質と同方向に配向する色素⁽³⁾で GUV を染色することにより，色素は膜表面の法線方向に配向する．したがって膜形状から色素の配向方向が厳密に評価できるため，配向方向と励起方向に対する SHG 強度の相関を求めることができる．

Fig. 4 に Fig. 3 上の断面①，②における各励起方向の SHG 像を，それぞれ(a)，(b)，(c)および(d)，(e)，(f)に示す．断面①では x, y 平面内に分子が配向しており，x, y 励起でそれぞれの方向に配向した膜分子が励起されているが，z 方向の分子配向をもつ断面②に近づくにつれて SHG 強度は減衰した．一方，z 励起では，断面②においても x, y 励起に比べて強度は減少は少ない．

同様の手法で GUV を全体積スキャンすることで，あらゆる配向方向について励起方向と SHG 強度の相関を特定する．このように SHG 検出効率の校正情報の取得を行うことにより，正確な 3 次元配向角度を行った．

5. 結言

我々は，ビーム断面内の位相を制御することにより，3 次元空間中に 3 次元ベクトルを描くように分子配向を測定できる 6 次元 SHG 顕微鏡を構築した．そして，配向計測をさらに高精度化するため，GUV を用いた校正を用いることにより，3 次元分子配向の空間分布を高精度化し，コラーゲンの 3 次元配向方向の計測を行った．

この 6 次元 SHG 顕微鏡の開発により生体分子の 3 次元配向計測への応用をめざしている．例えば，コラーゲンのほかにチューブリン，ミオシンからも SHG が発生することが知られており，6 次元 SHG 偏光顕微鏡はこれらの分子配列の向き，密度，規則性を 3 次元方向，3 次元空間分解能で測定できる新しい顕微鏡である．

Fig. 4 SHG images of human Achilles' tendon excited with three orthogonal electric field. Scale bar, 30 μ m.

Fig.5 Structure of GUV membrane

Fig. 6 SHG images in the section of center (a), (b), (c) and top height (d), (e), (f) of GUV with three orthogonal electric field. Scale bar, 10 μ m.

また，新たな細胞機能の解明のためのツールとして，本システムを膜ひずみの検出への応用を検討している．細胞膜分子の流れによる傾きを検出することで膜に働くせん断応力を観測し，応力分布と応答部位との相関を調べることで，細胞の応力受容特性の解明に役立てたい．

参考文献

- (1) K. Yoshiki, M. Hashimoto and T. Araki, Jpn. J. Appl. Phys., **44**, (2005), 1066-1068.
- (2) S. Fine, W. P. Hansen, Appl. Opt., **10**, (1971), 2350-2353.
- (3) A. Darszon, C. A. Vandenberg, M. Schönfeld, and M. H. Ellisman, N. C. Spitzer, and M. Montal, Proc. Natt. Acad. Sci.