

可視 2 光子励起を用いた共焦点顕微鏡の高速化・高空間分解能化  
**Improvement of spatial- and temporal resolution of visible-wavelength two-photon  
excitation confocal microscopy**

久保俊貴<sup>1</sup>、天満健太<sup>1,2</sup>、桶谷亮介<sup>1</sup>、杉浦一徳<sup>3</sup>、魯 慨<sup>3</sup>、Nicholas I. Smith<sup>4</sup>、

松田知己<sup>3</sup>、永井健治<sup>3,5</sup>、藤田克昌<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科、<sup>2</sup>産総研・阪大先端フォトバイオ、<sup>3</sup>大阪大学産業技術研究所、<sup>4</sup>大阪大学免疫学フロンティア研究センター、<sup>5</sup>大阪大学先導的学際研究機構

E-mail: kubo@ap.eng.osaka-u.ac.jp

私たちは、多色蛍光イメージングに適した励起方法である可視光を用いた 2 光子励起(v2PE)と、それを用いた共焦点顕微鏡の開発を行ってきた。波長およそ 530 nm による 2 光子励起を用いると、多くの蛍光タンパク質に共通する 280 nm 付近の吸収ピークを利用できるため、単一波長により、様々な色の蛍光タンパク質を同時に励起することができる。また、比較的短い励起波長を用いて、励起光強度に対して 2 次の非線形性を持つ蛍光発光を誘起できるため、共焦点顕微鏡への応用において、高い空間分解能が得られる。

本研究では、v2PE を用いた共焦点顕微鏡の、高解像度化および高速化に取り組んだ。ここでは、高空間分解能化についての成果を示す。v2PE を、光スイッチング蛍光タンパク質の光アクティベーションに利用した。off 状態の光スイッチング蛍光タンパク質を 560nm の 2 光子励起により on 状態に遷移させ、続く 488 nm の 1 光子励起により蛍光発光を誘起する。合わせて 3 光子の吸収による発光過程を、可視光のみで実現できるため、より高次の非線形性および、高い空間分解能が得られる。これを共焦点顕微鏡に応用し、生きた HeLa 細胞のアクチンフィラメントに光スイッチング蛍光タンパク質 Skylan-NS を発現させた試料の蛍光像を取得した。通常の共焦点顕微鏡による観察像と比較して、高い空間分解能と像コントラストが得られた。