

小林 孝嘉

国立大学法人電気通信大学 先端超高速レーザー研究センター 特任教授

高性能レーザーによる細胞光イメージング・光制御と光損傷機構の解明

§1. 研究実施の概要

電通大グループ(Dグループ)は、多色レーザー光による多重イメージングを行うため、市販の顕微鏡に多色レーザー光を導入する方法を検討した。レーザー装置と顕微鏡との間に空間的な隔りがあるため 6 m 程度の光ファイバーを使ってレーザー光を伝送する必要がある。顕微鏡に光伝送用のシングルモードファイバーが備え付けられているが、3 m しかなく、不足している。そのため、2本のファイバーを接続し、6 m とした。この際ファイバーカップラーを作製し、用いた。カップラーでの光損失効果は小さく、実験に支障のない損失量であることを確認した。また、多色レーザー光の繰り返し周波数は 1kHz であり、現状の顕微鏡のスキャンスピードと比べて低く、撮像できない。顕微鏡のスキャンスピードを低周波へ落とし、撮像できる条件とする必要がある。これが可能な特注ソフトウェア導入を検討しており、仕様についてメーカーと検討が終わっている。ソフトウェア導入後、ファイバーにより多色レーザー光を顕微鏡に導波することで多色イメージングが可能となる。

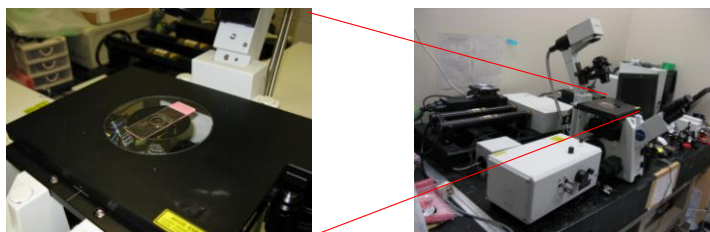
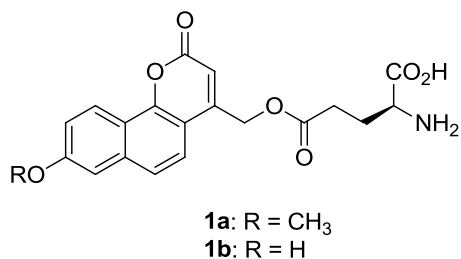


図 1

東京大グループ(Tグループ)は、光刺激によるシナプス可塑性誘発法の開拓のため、カルシウム、グルタミン酸および GABA を利用し、これらの物質の光制御に最適なレーザーパルス幅、エネルギー、波長等を測定する実験を、2光子顕微鏡を用いて推進した。その結果、光刺激によるシナプス収縮の高効率な誘発法が開発され、収縮のメカニズムの解明を進めた。さらに、新しいケージド試薬を用いて、多色イメージングへの応用法も確立していく予定である。

広島大グループ(Hグループ)は、光刺激法に必須なケージド分子として、まずグルタメート・ケージド化合物 **1a,b** を選択し、その合成を行った。さらにこれらの分子の紫外吸収、発光スペクトル、相対発光効率を測定した。さらに、光照射によって光反応性評価を行った。次年度においては、

水溶性が高く、反応効率の高いケージド分子を目指してその合成法を確立していく予定である。



§2. 研究実施体制

(1) 電通大グループ

① 研究分担グループ長: 小林 孝嘉 (電気通信大学先端超高速レーザー研究センター, 特任教授)

② 研究項目

- ・多色レーザーの開発
- ・多色イメージング法の開発
- ・光解離機構の解明
- ・紫外光による光生物反応機構解明

(2) 東京大グループ

① 研究グループ長: 河西 春郎 (東京大学大学院医学系研究科, 教授)

② 研究項目

- ・光活性物質の作用機構の解明
- ・多色イメージング法の大脳棘シナプス研究への応用
- ・光ケージド物質の生体への応用

(3) 広島大グループ

① 研究グループ長: 安倍 学 (広島大学大学院理学研究科, 教授)

② 研究項目

- ・光解離性分子の合成
- ・光解離性分子の物性評価
- ・光解離性分子の光反応

§3. 研究実施内容

(文中の引用番号等は(4-1)に対応する)

電通大グループは、22年10月から23年2月中旬の期間、少ない人数でICORPビデオ撮影・作成、終了報告書作成に追われ、大学キャンパスでは十分な実験・研究は出来なかった。その後の地震でさらにレーザー実験がストップした。そのような状況と、限られた時間のなかで以下の研究を進めた。

四光波混合によって発生するイメージング用光源が優れた特性を有する機構を解明した^{D1}。

さらに、光解離・光劣化の機構を解明するための多次元反応空間の超曲面決定の手法に関する実験と考察を行った。

紫外光パルス、深紫外光パルスを用いた超高速分光実験の準備を行った。それまで準備してきた紫外パルスレーザーおよび深紫外パルスレーザーの安定化を行った。それを行っている途中で大地震が発生した。その後、実験は計画停電のために、進展は少し遅れている。

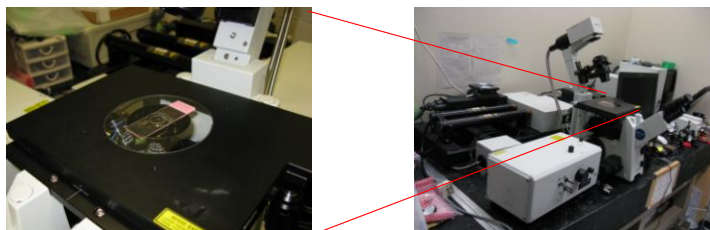


図 1

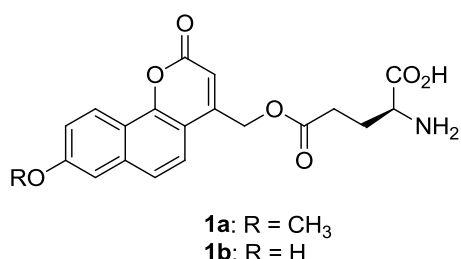
多色レーザー光による多重イメージングに関しては以下のとおりである。市販の顕微鏡に多色レーザー光を導入する方法を検討した。レーザー装置と顕微鏡との間に空間的な隔りがあるため6 m程度の光ファイバーを使ってレーザー光を伝送する必要がある。顕微鏡に光伝送用のシングルモードファイバーが備え付けられているが、3 mしかなく、不足している。そのため、2つのファイバーを接続し、6 mとした。この際ファイバーカップラーを作製し、用いた。カップラーでの光損失は小さく、実験に支障のない損失量であることを確認した。また、多色レーザー光の繰り返し周波数は1kHzであり、現状の顕微鏡のスキャンスピードと比べて低く、撮像できない。顕微鏡のスキャンスピードを低周波へ落とし、撮像できる条件とする必要がある。これが可能な特注ソフトウェア導入を検討しており、仕様についてメーカーと検討が終わっている。ソフトウェア導入後、ファイバーにより多色レーザー光を顕微鏡に導波することで多色イメージングが可能となる。

東京大グループ(Tグループ)は、光刺激によるシナプス可塑性誘発に最適な条件を測定する実験を、2光子顕微鏡を用いて推進した。特に、ケージド試薬のうちRubi GABAおよびCDNI-Gluを主に用いて、これらの物質の光制御に最適なレーザーパルス幅、エネルギー等を測定する実験を行った。その結果、レーザーパルス幅については、比較的短い波長がカルシウムの刺激に有効であること、また、エネルギーについては、低いエネルギーがスパイン収縮の誘発に適するという実験結果を得、その評価および検討を実施した。さらに、新しいケージド試薬を用いて、多色イメージングへの応用法も確立していく予定である。

広島大グループは、新規光解離性化合物の合成・光反応性およびバイオアッセイへのサンプル提供を行うことを本研究の目的としている。目的達成の参考になる研究として、カルボニル化合物の光反応性に関する研究も実施した^{H1-H2}。

光刺激法に必須なケージド分子として、まずグルタメート・ケージド化合物 **1a,1b** を選択し、その合成を行った。手続きとしては、市販化合物からクマリン誘導体を合成し、そのクマリン誘導体を使って新規ケージド化合物 **1a, 1b** を合成した。

さらに **1a,1b**, およびその前駆体についてこれらの分子の紫外吸収スペクトル、発光スペクトル、相対発光効率を測定した。さらに、光照射によって光反応性評価を行った。次年度においては水溶性が高く、反応効率の高いケージド分子を目指してその合成法を確立していく予定である。



§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

- D-1. J. Liu, K. Okamura, Y. Kida, and T. Kobayashi, “Femtosecond pulses cleaning by a transient-grating process in Kerr-optical media”, *Chinese Opt. Lett.* (in press)
- H-1. Y. Yabuno, Y. Hiraga, R. Takagi, and M. Abe, “Concentration and Temperature Dependency of Regio- and Stereoselectivity in a Photochemical [2+2] Cycloaddition Reaction (the Paterno-Buchi Reaction): Origin of the Hydroxy-group Directivity”, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, pp. 2592-2604, 2011 (DOI: 10.1021/ja1088524)
- H-2. K. Hisamoto, Y. Hiraga, and M. Abe, “Hydroxy-group Effect on the Regioselectivity in a Photochemical Oxetane Formation Reaction (the Paternò-Büchi Reaction) of Geraniol Derivatives”, *Photochemical & Photobiological Sciences*, in press.) (DOI:10.1039/C1PP05056G)

(4-2) 知財出願

① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)