

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
 - ・誘導放出・散乱イメージング
 - ・光劣化初期過程機構の研究
 - ・2光子励起スペクトル測定

(2) 東京大グループ

- ① 研究分担グループ長: 河西 春郎 (東京大学大学院医学系研究科, 教授)
- ② 研究項目
 - ・カルシウムアンケイジング法によるシナプス前終末研究法の開拓
 - ・2色アンケイジング法によるシナプス競合機構の研究。
 - ・多光子イメージングの応用・

(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

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

電通大グループは、24年度においては前年度に構築した誘導放出(ポンプ-プローブ)顕微鏡を利用してパルス及びCW光源を用いた誘導放出イメージングを行った。具体的には量子ドットで標識したマウスT細胞や河西グループの準備されたYFP標識された神経細胞を対象とした生体標本試料の測定に成功した(図)。小林グループメンバーの鶴井(順天堂大)の準備したT cellの量子ドット(QD)誘導放出媒体とするイメージングに成功した。さらに誘導放出を利用した寿命イメージングのための顕微測定システムを構築し、生体物質の環境に近い濁った状態の蛍光試料を対象に、CWレーザーをへんちょうすることで寿命を測定することに成功した。さらに、これを寿命イメージングに用いる予定である。

・マルチプレックス誘導ラマンイメージング

生体内分子の無標識多色イメージングを目指し、ピコ秒パルス光源による白色プローブ光と我々の開発した多(128)チャンネルロックイン検出器を用いて、マルチプレックス誘導ラマン顕微鏡の開発をした。この顕微鏡によりポリスチレン(PS)とポリメタクリル酸メチル(PMMA)混合膜中の各点における誘導ラマンスペクトルイメージングを行った。

(ii)光劣化初期過程機構の研究

生体分子の紫外光劣化機構研究用の紫外パルス光として開発したサテライトパルスの無い良いスペクトル特性のパルス光源を用いて、チミン、ウラシル等の核酸塩基の励起状態を10fsの時間分解分光測定を行った。更に、フェニルアラニン等のアミノ酸の測定も開始した。

(iii)2光子励起スペクトル測定

2光子顕微鏡等の実験の研究のために、2光子吸収スペクトルは重要であるが、これまでの測定は、ほとんどの場合レーザー波長を変えながら測定していたためそのスペクトル波形の信頼性が低かった。以前開発した多(128)チャンネルロックイン検出器と、フェムト秒パルスとそれを励起光とする白色光を用いて新しい2光子吸収スペクトル装置を開発した。それを用いてアントラセン誘導体などの典型的な分子のスペクトルを測定した。更に、安倍グループの合成したアンケーシジン分子の2光子吸収スペクトルの測定を行いこれからの合成の指針を得ることが出来た。

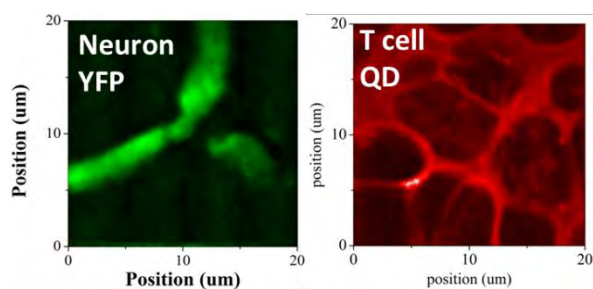


図 誘導放出イメージング画像

左: YFPでマークした神経細胞軸索 右: 量子ドットでマークしたマウスのT細胞

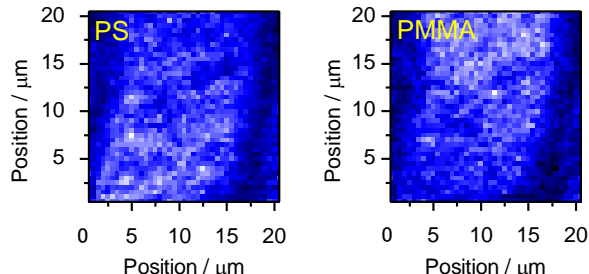
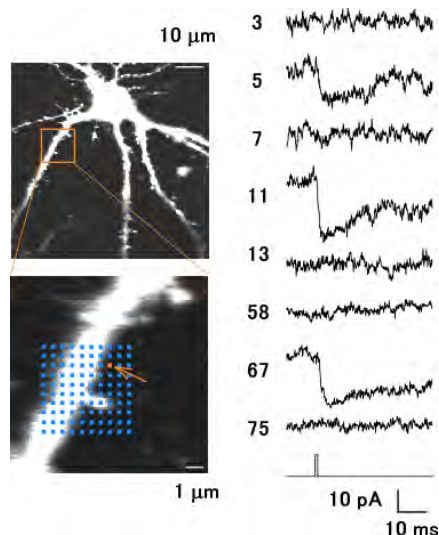


図 ポリマー混合膜の同時多色誘導ラマンイメージ 左: PSのラマンバンドによるイメージ 右: PMMAのラマンバンドによるイメージ

東京大グループは、東京大グループ多色の2光子アンケージング・イメージング法を展開するための応用開発を続けた。

(1)カルシウムアンケージング法によるシナプス前終末研究法の開拓

広島大グループが試作した2光子対応ケイジドCa²⁺試薬の AM-ester を大脳皮質培養系に負荷し、シナプス前部を光刺激し、パッチクランプした細胞からシナプス後応答を得ることに成功した。右図では 1ms@720nm の2光子励起で多数の青い点をマップした(拡大図)。マップを 100 回繰り返すと、5,11,67 回目に樹状突起の一点(矢印)でシナプス後応答が得られた。この応答率は概して 0.03 位だが、電気刺激では 0.2-0.6 に達する。この方法論の原理的な有効性が示されたので、この応答率を上げるために2光子吸収の高い試薬の開発を広島大グループと進める(未発表)。



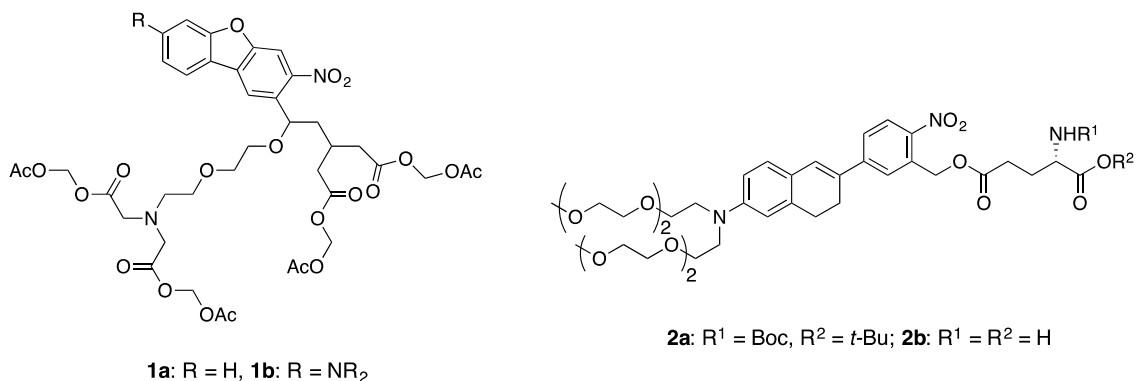
(2)2色アンケージング法によるシナプス競合機構の研究。

ケイジドグルタミン酸(720 nm)とケイジド GABA(458 nm)を同時に用いて、大脳錐体細胞のスパインシナプスの収縮や競合を起こすことに成功した。しかし、グルタミン酸刺激は細胞内 Ca²⁺上昇を GABA 刺激はその抑制を起こすので、何故、グルタミン酸刺激をコントロールすることで収縮が起きず、GABA が必要なのか説明が求められた。我々は、遅い結合速度を持つ Ca²⁺バッファーである EGTA を細胞内に投与すると、GABA 作用が模倣され収縮が起きたが、速い結合定数を持つ BAPTA ではどの濃度でも収縮が誘発されないことを見いだした。これは、スパイン収縮にはグルタミン酸受容体による局所(50nm)の強いカルシウム上昇が必須で、これに加えて GABA による大域的なカルシウム上昇の抑制が必要で、この二重性のために、グルタミン酸と GABA の両方が必要であることが示された(投稿中)。

(3)多光子イメージングの応用

多色2光子イメージングにより、膵臓ランゲルハンス島のインスリン開口放出の蛍光観察を行い、Munc18b という分泌制御蛋白の役割を解明した[T4]。

広島大グループでは、平成24年度の研究において、河西グループにて実施されるバイオアッセイへのサンプル提供と小林グループとの協同研究による光解離過程の機構解明のため、(1)カルシウムケイジド化合物の AM エステル 1 と(2)グルタミン酸ケイジド化合物 2 の分子設計と分子合成を実施した。合成したサンプルは、現在、河西グループによりバイオアッセイ中である。小林グループとの光解離過程の反応機構に関する研究では[H1,2], 光照射により生じる励起状態分子の反応挙動を調査する研究を進めた [H3,4]. 以下にその概要を記す。



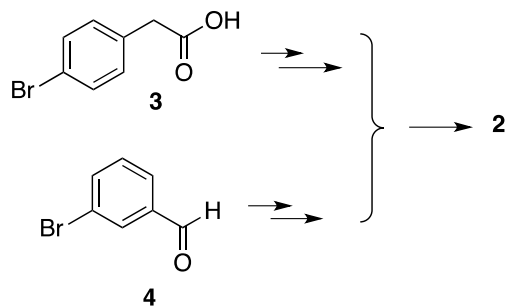
(1)カルシウムケージド化合物 **1** の合成と試験管(in vitro)における光解離性

カルシウムケージド化合物 **1** の合成は、入手可能なベンゾフラン骨格から総収率 4%で合成した。弱塩基性の条件下(pH = 7.4 in HEPES buffer 中)で、**1a** の光解離反応を実施した。その結果、確かに、**1a** の分解反応を確認した。

(2)グルタミン酸ケージド化合物 **2** の合成とその光解離性

グルタミン酸ケージド化合物 **2a** の合成は、市販の原料 **3** と **4** から合計15段階をへて総収量15%で合成した。バイオアッセイには、水溶性が必要であるので、水溶性を確かめたところ、pH = 7.4 HEPES buffer 中において 114 mM の水溶性を有していることが分かった。通常、バイオアッセイには、10 mM の水溶性が必要であることが分かっているため、本研究で合成した **2a** は、バイオアッセイに必要な十分な水溶性を有している。

次に、合成した **2a** の光解離性を確かめるために、pH = 7.4 HEPES buffer 中での光解離実験を試みた。その結果、確かに、グルタミン酸の放出を観測した。



§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

【電通大チーム】

D1. S. Yukita, N. Shiokawa, H. Kanemaru, H. Namiki, T. Kobayashi and E. Tokunaga, “Deflection switching of a laser beam by the Pockels effect of water”, Appl. Phys. Lett. Vol.100, No.17, pp.171108-1~3, 2012 (DOI: 10.1063/1.4705154)

- D2. J. Harra, J. Mäkitalo, R. Siikanen, M. Virkki, G. Genty, T. Kobayashi, M. Kauranen, and J. M. Mäkelä, "Size-controlled aerosol synthesis of silver nanoparticles for plasmonic materials", *Journal of Nanoparticle Research*, Vol.14, No.6, pp. 870, 2012 (DOI: 10.1007/s11051-012-0870-0)
- D3. C.W. Luo, I. H. Wu, P. C. Cheng, J.-Y. Lin, K. H. Wu, T. M. Uen, J.Y. Juang, T. Kobayashi, D. A. Chareev, O. S. Volkova, and A. N. Vasiliev, "Quasiparticle dynamics and phonon softening in FeSe superconductors", *Physical Review Letters*, Vol.108, Issue 25, pp.257006, 2012 (DOI: 10.1103/PhysRevLett.108.257006)
- D4. I. Iwakura, A. Yabushita, J. Liu, K. Okamura, and T. Kobayashi, "Photo-impulsive reactions in the electronic ground state without electronic excitation: non-photo, non-thermal chemical reactions", *Physical Chemistry Chemical Physics*, Issue14, pp.9696-9701, 2012 (DOI: 10.1039/C2CP40607A)
- D5. S.-C. Chen, Y.-K. Liao, H.-J. Chen, C.-H. C., C.-Huang Lai, Y.-L. C., H.-C. Kuo, K.-H. Wu, J.-Y. Juang, S.-J. Cheng, T.-Po H., and T. Kobayashi, "Ultrafast carrier dynamics in Cu(InGa)Se₂ thin films probed by femtosecond pump-probe spectroscopy", *Optics Express*, Vol. 20, Issue 12, pp. 12675-12681, 2012 (<http://dx.doi.org/10.1364/OE.20.012675>)
- D6. L. Y. Chen, J. C. Yang, C. W. Luo, C. W. Laing, K. H. Wu, J.-Y. Lin, T. M. Uen, J. Y. Juang, Y. H. Chu, and T. Kobayashi, "Ultrafast photoinduced mechanical strain in epitaxial BiFeO₃ thin films", *Appl. Phys. Lett.*, Vol.101, Issue4, pp.41902, 2012 (<http://dx.doi.org/10.1063/1.4734512>)
- D7. H. I. Wang, W. T. Tang, P. S. Tseng, L.W. Liao, C. W. Luo, C.-S. Yang and T. Kobayashi, "Femtosecond laser-induced formation of wurtzite phase ZnSe nanoparticles in air", *Journal of Nanomaterials*, Vol.2012, 2012(DOI:10.1155/2012/278364)
- D8. Y. Kida, K. Okamura, J. Liu and T. Kobayashi, "Sub-10-fs deep-ultraviolet light source with stable power and spectrum", *Appl. Opt.*, Vol. 51, Issue 26, pp.6403-6410, 2012 (<http://dx.doi.org/10.1364/AO.51.006403>)

- D9. C. W. Luo, W. T. Tang, H. I. Wang, L. W. Liao, H. P. Lo, K. H. Wu, J.-Y. Lin, J. Y. Juang, T. M. Uen, and T. Kobayashi, "Controllable subwavelength-ripple and -dot structures on YBa₂Cu₃O₇ induced by ultrashort laser pulses", *Supercond. Sci. Technol.* Vol.25, No.11, pp.115008, 2012 (DOI:10.1088/0953-2048/25/11/115008)
- D10. C. W. Luo, I. H. Wu, P. C. Cheng, J.Y. Lin, K. H. Wu, T. M. Uen, J. Y. Juang, T. Kobayashi, Y. C. Wen, T. W. Huang, K. W. Yeh, M. K. Wu, D. A. Chareev, O. S. Volkova and A. N. Vasiliev, "Ultrafast dynamics and phonon softening in Fe_{1+y}Se_{1-x}Te single crystals", *New Journal of Physics*, Vol.14, pp.103053, 2012 (DOI:10.1088/1367-2630/14/10/103053)
- D11. J. Liu, F. J. Li, Y. L. Jiang, C. Li, Y. X. Leng, T. Kobayashi, R. X. Li, and Z. Z. Xu, "Transient-grating self-referenced spectral interferometry for infrared femtosecond pulse characterization", *Optics Letters*, Vol.37, No.23, pp.4829-4831, 2012 (DOI: 10.1364/OL.37.004829)
- D12. J. He, J. Du and T. Kobayashi, "Low-threshold and compact multicolored femtosecond laser generated by using cascaded four-wave mixing in a diamond plate", *Optics Communications*, Vol.290, pp.132-135, 2013 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.optcom.2012.10.025>)
- D13. I. Iwakura, Y. Kaneko, S. Hayashi, A. Yabushita, and T. Kobayashi, "The Reaction Mechanism of Claisen Rearrangement obtained by Transition State Spectroscopy and Single Direct-Dynamics Trajectory", *Molecules*, Vol.18, pp.1995-2004, 2013(DOI: 10.3390/molecules18021995)
- D14. T. Kobayashi, "Development of Ultrafast Spectroscopy and Reaction Mechanisms Studied by the Observation of Ultrashort-Life Species and Transition States", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, Vol. 86 , No.2, pp. 167–182, 2013(Award Accounts) (DOI: 10.1246/bcsj.20120250) Chemical Society of Japan Award
- D15. T. Kobayashi, T. Iiyama, K. Okamura, J. Du, and T. Masuda, "Ultrafast electronic relaxation and vibrational dynamics in a polyacetylene derivative", *Chemical Physics Letters*, available online 13 March 2013 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2013.02.068>)

D16. J. Liu, A. Yabushita, S. Taniguchi, H. Chosrowjan, Y. Imamoto, , K. Sueda, N. Miyanaga, T. Kobayashi, “Ultrafast Time-Resolved Pump-Probe Spectroscopy of PYP by a Sub-8fs Pulse Laser at 400 nm”, *J. Phys. Chem. B*, March 27, 2013 (in press) (DOI: 10.1021/jp4001016)

【東京大チーム】

T1. Kimura, Y., Momotake, A., Takahashi, N., Kasai, H. & Arai, T. (2012) Polarity-dependent photophysical properties of hemicyanine dyes and their application in 2-photon microscopy biological imaging. *Chemistry Letters* 41:528-530. (DOI: 10.1246/cl.2012.528).

T2. Ogata, S., Miki, T., Seino, S., Tamai, S., Kasai, H. & Nemoto, T. (2012). A novel function of Noc2 in agonist-induced intracellular Ca²⁺ increase during ymogen-granule exocytosis in pancreatic acinar cells. *PLoS ONE* 7: e37048. (DOI: 10.1371/journal.pone.0037048).

T3. Hira, R., Ohkubo, F., Ozawa, K., Isomura, Y., Kitamura, K., Kano, M., Kasai, H., & Matsuzaki, M. (2013). Spatial and temporal reconfiguration of microcircuitry activity in the motor cortex for voluntary movement. *J. Neurosci.* 33:1377-1390. (DOI:10.1523/JNEUROSCI.2550-12.2013).

T4. Lam, P.*, Ohno, M.*, , Subhankar, D.*, He, Y., Qin, T., Lian, T., Zhu, D., Kang, Y., Liu, Y., Kauppi, M., Xie, L., Wan, W., Bin, N., Sugita, S., Olkkonen, V., Takahashi, N., Kasai, H.^{CA} & Gaisano, H. Y.^{CA} (2013). Munc18b is a major mediator of insulin exocytosis in rat pancreatic β -cells. *Diabetes*. In press. (* Equal contribution, ^{CA}Corresponding authors.)

【広島大チーム】

H1. Substituent Effect on Reactivity of Triplet Excited State of 2,3-Diazabicyclo[2.2.1]hept-2-enes, DBH Derivatives: CN Bond Cleavage versus CC Bond Cleavage. Abe, M.; Watanabe, Tamura, H.; Boinapally, S.; Kanahara, K.; Fujiwara, Y. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 1940-1948. (DOI: 10.1021/jo3019472)

H2 A novel non-metathetic behavior of Grubbs catalyst: Ruthenium-mediated intra-molecular [3 + 2] cycloaddition of bis-1,3-dienes. Takagi, R.; Yamamoto, K.; Hiraga, Y.; Kojima, S.; Abe, M. *J. Organometallic Chem.*, **2013**, *723*, 171-175. (DOI: 10.1016/j.jorganchem.2012.09.004)

H3 Stretch Effects Induced by Molecular Strain on Weakening s-Bonds: Molecular Design of Long-Lived Diradicals (Biradicals). Abe, M.; Furunaga, H.; Ma, D.; Gagliardi, L.; Bodwell, G. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7612-7619. (DOI: 10.1021/jo3016105)