

「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」
平成 22 年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

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

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 研究代表者: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 主たる共同研究者: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 主たる共同研究者: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

(文中の引用番号等は(3-1)に対応する)

電通大グループは、23年5月頃からレーザー実験室引越しの準備を始め、10月・翌年2月に掛けて引越し後のレーザー・測定器の調整を行った。このような状況と、限られた時間のなかで以下の研究を進めた。

(1) イメージング

多色レーザー光による多重イメージングの実現に向け、多色レーザーを同軸上に束ねる光学系の検討、構築を行った。さらに、時間的に多色パルス列をコントロールするための音響光学素子を導入した。多色レーザー光の繰り返し周波数は1kHzであり、現状の市販の顕微鏡を用いて実現するにはスキャンスピードと比べて低く撮像できない。そこでスキャンスピードを低周波へ落とし撮像できる特注ソフトウェアを導入した。同時に、多色イメージングにより柔軟に対応できるように顕微鏡を自作し、多波長同時観測可能な128チャンネルロックインアンプを検出器に用いてその性能評価を行った。実際に順天堂大で準備した試料を用いたイメージングを行った。(図)

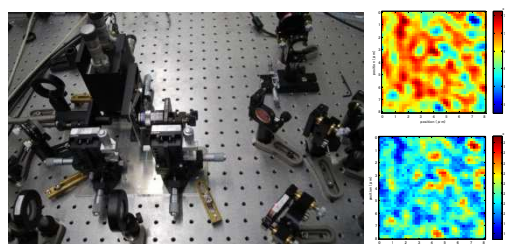


図 多重イメージング用に作製した顕微鏡と、性能確認のため128chロックインアンプを用いて測定した量子ドット混合系のサブマイクロ相分離パターン

(2) 光劣化機構・光解離過程の研究

光劣化機構・光解離過程の研究には良い特性のパルス光源が必要であるフェムト秒光源を開発した。紫外光劣化機構研究用の紫外パルス光として、過渡格子を用いたサテライト光のないクリーンな紫外パルス発生法[D1,9]、四光波混合と高次分散補償によるサブ10fs紫外パルス発生法[D6]、非共直線四光波混合による波長可変サブ40fs紫外パルス発生法を開発した。光劣化機構に関わる光反応機構の解明を目的として以下の研究を行った。基礎原理の提案と実証実験[D2]、イメージング用等に用いられる蛍光色素の劣化に関わる機構[D8]、生体関連物質としてクロロフィル[D4,5,7]、バクテリオロドプシンについて緩和過程の研究を行った。光解離機構に関してビシクロヘプテン誘導体の光脱窒素化、酸化ヘモグロビンの光解離(酸素脱離)[D3]。招待論文として、開発した深紫外サブ10fsパルスの開発に関するまとめと、それをを用いたサブ10fs・128チャンネル分光によるチミンの励起状態のダイナミクスについて執筆した[D9,10]。

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

(1) 個体動物における2光子グルタミン酸アンケーシング法の適用

2光子グルタミン酸アンケーシング法はこれまで脳スライス標本に広く応用されて

きたが、その個体動物への応用可能性は未開拓だった。我々は、脳表面からケージド試薬を投与すると、23%に及ぶ細胞間隙を通して脳表から150ミクロンにおいて脳表の約50%の濃度に達することを示し、個体脳における定量的機能的なグルタミン酸受容体のマッピング(720nm)に初めて成功した。マップは再現性よく取られ、スパインの形態機能連関は個体脳においても使われていることが確認された[T3]。

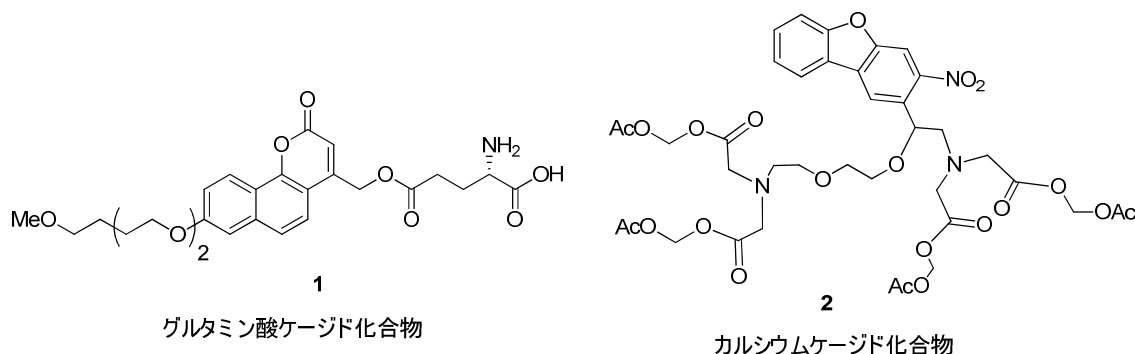
(2) 2光子 GABA アンケイジング法と2光子カルシウムイメージング法の同時使用による樹状突起 Ca シグナルの研究

新規に合成した2光子 GABA アンケイジング法(720nm)を用いて、錐体細胞樹状突起の GABA 受容体の分布を測定した結果、樹状突起にはほぼ一様に分布するが、特にその分岐部に発現が高いことが分かった。更に、Ca イメージング(830nm)を行い逆行性活動電位による一過性 Ca 上昇に対する GABA 受容体の作用を GABA アンケイジング法で調べた結果、GABA 受容体は一過性 Ca 上昇を抑制するが、その効果は局所的で20ミクロン以上広がらないことが明らかになった[T4]。

(3) 2光子イメージングの応用

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や個体脳の蛍光観察をする研究を進めた[T2,T5]。

広島大グループでは、平成23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光解離過程の機構解明のため、以下に示すグルタミン酸ケージド化合物1とカルシウムケージド化合物2の合成とその光解離反応の研究を進めた[H2, H3]。カルボニル基の光反応(H4, H5)とその中間体であるビラジカルの反応性[H1]に関する研究も実施した。



(1) グルタミン酸ケージド化合物1の合成とその光反応

高い2光子吸収能が期待される拡張クマリン骨格を持つグルタミン酸ケージド化合物1の合成は、入手可能なナフタレン1,6-ジオールから、8段階の合成経路を経て総収率15%で合成した。その光反応をメタノール、DMSO、DMF中で行い、化合物1の光反応で、グルタミン酸が生じることをNMRにより確認した。この結果は、24年度に実施する高い水溶性を有するケージド化合物の合成指針に大きな情報を与えた。

(2) カルシウムケージド化合物の2の合成

高い水溶性と2光子能を備えたカルシウムケージド化合物2の合成を入手可能なベンゾ

フラン骨格から1-4段階、収率2%で合成した。今後、河西グループへのバイオアッセイに必要な100mgを合成し、サンプル提供する予定である。

§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. J. Liu, K. Okamura, Y. Kida, and T. Kobayashi, “Femtosecond pulses cleaning by a transient-grating process in Kerr-optical media”, *Chin. Opt. Lett.*, vol. 9, No. 5, p. 051903, 2011 (DOI: 10.3788/COL201109.051903)
- D2. T. Teramoto, J. Du, Z. Wang, J. Liu, E. Tokunaga, and T. Kobayashi, “Development of real-time vibrational spectroscopy of molecules in electronic excited states: Towards mapping molecular potential energy hypersurfaces”, *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 28, No. 5, pp. 1043-1050, 2011 (DOI: 10.1364/JOSAB.28.001043)
- D3. T. Kobayashi, and A. Yabushita, “Ultrafast dynamics of excited state in oxy-hemoglobin”, *Chin. Opt. Lett.*, vol. 9, No. s1, pp. s10605(3), 2011 (DOI: 10.3788/COL201109.s10605)
- D4. J. Du and T. Kobayashi, “Real-time vibrational mode-coupling observed using a few-cycle pulse laser”, *Chin. Opt. Lett.*, vol. 9 suppl., pp. S10601(1-3), 2011 (DOI: 10.3788/COL201109.S10601)
- D5. J. Du, K. Nakata, Y. Jiang, E. Tokunaga, and T. Kobayashi, “Spectral modulation observed in Chl-a by ultrafast laser spectroscopy (Editors’ selection for inclusion in VJBO)”, *Opt. Exp.*, vol. 19, No. 23, pp. 22480-22485, 2011 (DOI: 10.1364/OE.19.022480)
- D6. Y. Kida, J. Liu, and T. Kobayashi, “Single 10-fs deep-ultraviolet pulses generated by broadband four-wave mixing and high-order dispersion compensation”, *Appl. Phys. B*, vol. 105, pp. 675-679, 2011 (DOI: 10.1007/s00340-011-4809-4)
- D7. J. Du, T. Teramoto, K. Nakata, E. Tokunaga, and T. Kobayashi, “Real-time vibrational dynamics in chlorophyll a studied with a few-cycle pulse laser”, *Biophys. J.*, vol. 101, No. 4, pp. 995-1003, 2011 (DOI: 10.1016/j.bpj.2011.07.011)
- D8. Y. Jiang, B. Zhao, K. Sueda, N. Miyanaga and T. Kobayashi, “Tunable sub-40 fs ultraviolet pulses from a non-collinear four-wave mixing in CaF₂ Crystal”, *Chin. Opt. Lett.*, vol. 9, No. s1, p. s10604, 2011 (DOI: 10.3788/COL201109.S10604)
- D9. T. Kobayashi, J. Liu, and Y. Kida, “Generation and optimization of femtosecond pulses by

- four-wave mixing process (Invited Paper)", IEEE J. Quantum Electronics, Selected Topics, vol. 18, No. 1, pp. 54-65, 2012 (DOI: 10.1109/JSTQE.2011.2105256)
- D10. T. Kobayashi and Y. Kida, "Ultrafast spectroscopy with sub-10-fs deep-ultraviolet pulses", Phys. Chem. Chem. Phys. (Advance Article), published on web 2012/02 (DOI: 10.1039/C2CP23649D)

【東京大チーム】

- T1. M. Matsuzaki, G.C.R. Ellis-Davies, Y. Kanemoto, and H. Kasai, "Simultaneous two-photon activation of presynaptic cells and calcium imaging in postsynaptic dendritic spines". Neural Systems and Circuits vol. 1, p.2, 2011 (DOI:10.1186/2042-1001-1-2)
- T2. T. Cai, H. Hirai, G. Zhang, M. Zhang, N. Takahashi, H. Kasai, L.S. Satin, R.D. Leapman, and A.L. Notkins, "Decreased in the number of dense core vesicles is responsible for the impaired secretion of insulin in IA-2 and IA-2 β null mice", Diabetologia, vol. 54, pp. 2347-57, 2011 (DOI: 10.1007/s00125-011-2221-6)
- T3 J. Noguchi, A. Nagaoka, S. Watanabe, G.C.R. Ellis-Davies, K. Kitamura, M. Kano, M. Matsuzaki, and H. Kasai, "In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice", J.Physiol. vol. 589, pp. 2320-2329, 2011 (DOI: 10.1113/jphysiol.2011.207100)
- T4. Y. Kanemoto, M. Matsuzaki, S. Morita, T. Hayama, J. Noguchi, N. Senda, A. Momotake, T. Arai, and H. Kasai, "Spatial distributions of GABA receptors and local inhibition of Ca²⁺ transients studied with GABA uncaging in the dendrites of CA1 pyramidal neurons", PLoS ONE, vol. 6, p. e22652, 2011 (DOI: 10.1371/journal.pone.0022652)
- T5. R. Ako, M. Wakimoto, H. Ebisu, K. Tanno, R. Hira, H. Kasai, M. Matsuzaki, and H. Kawasaki, "Simultaneous visualization of multiple neuronal properties with single-cell resolution in the living rodent brain", Mol. Cell. Neurosci., vol. 48, pp.246-257, 2011 (DOI: 10.1016/j.mcn.2011.08.005)

【広島大チーム】

- H1. M. Abe, J. Ye, M. Mishima, "The Chemistry of Localized Singlet 1,3-Diradicals (Biradicals): from Putative Intermediates to Persistent Species and Unusual Molecules with a π -Singlet Bonded Character", Chem. Soc. Rev., 2012 (DOI: 10.1039/c2cs00005a)

- H2. M. Abe, I. Iwakura, A. Yabushita, S. Yagi, J. Liu, K. Okamura, T. Kobayashi, "Direct Observation of Denitrogenation Process of 2,3-Diazabicyclo[2.2.1]hept-2-ene (DBH) Derivatives, Using a Visible 5-fs pulse laser", *Chem. Phys. Lett.*, vol. 527, pp. 79-83, 2012 (DOI: 10.1016/j.cplett.2012.01.024)
- H3. S. Yagi, Y. Hiraga, R. Takagi, and M. Abe, "Stereochemical Deuterium Labeling Study on the Denitrogenation of 7,7-Diethoxy-2,3-diazabicyclo[2.2.1]hept-2-ene", *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 24, 894-901, 2011 (DOI: 10.1002/poc.1872)
- H4. K. Hisamoto, Y. Hiraga, and M. Abe, "Hydroxy-group effect on the regioselectivity in a photochemical oxetane formation reaction (the Paterno-Buchi Reaction) of geraniol derivatives", *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 10, pp. 1469-1473, 2011 (DOI: 10.1039/c1pp05056g)
- H5. Y. Hiraga, T. Widiandi, T. Kunishi, and M. Abe, "The cooperative effect of a hydroxyl and carboxyl group on the catalytic ability of novel beta-homoproline derivatives on direct asymmetric aldol reactions", *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 22, No. 2, pp. 226-237, 2011 (DOI:10.1016/j.tetasy.2011.01.025)