

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13735

研究課題名（和文）無発光イメージング法確立に向けた分子開発

研究課題名（英文）Development of non-luminescent molecules for multimodal two-photon imaging

研究代表者

百武 篤也（MOMOTAKE, Atsuya）

筑波大学・数理物質系・講師

研究者番号：70375369

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：我々は本研究で、バイオイメージング分野の可視化技術にブレークスルーをもたらす分子として、無発光性のSHGイメージング専用分子を開発した。この分子は蛍光を全く放射せず、水溶性で容易に膜を染色し、市販の膜染色色素と比較しても非常に光耐久性が高かった。これによりノイズ蛍光の影響を全く受けることの無いSHGシグナルを得ることに成功した。次に、この無発光SHGイメージング色素で細胞膜を染色し、一方で細胞の内部のカルシウムイオンを従来の蛍光色素でイメージングする、マルチモーダルイメージングに世界で初めて成功した。

研究成果の概要（英文）：We have developed the first azobenzene-based, non-fluorescent and membrane potential-sensitive SHG-active organic dyes. These SHG-specific dyes showed high photo-stability and generates SH signals at the plasma membrane with virtually no fluorescent signals, in contrast to the previously used fluorescent membrane dyes. When tested in neurons, our SHG-specific dyes show linear membrane potential sensitivity and fast responses to action potentials, and also show significantly reduced photodamage compared with fluorescent membrane dyes. The SHG-specific nature of these dye allow simultaneous and completely independent imaging of SHG signals and fluorescent signals from various reporter molecules, including markers of cellular organelles and intracellular calcium. Therefore, these SHG-specific dyes enables true multimodal two-photon imaging in biological samples

研究分野：有機光化学

キーワード：SHGイメージング アゾベンゼン 細胞膜イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

生命現象の理解において、細胞レベル、分子レベルで起こる現象の可視化は必要不可欠な技術である。このために様々な顕微鏡が開発されてきたが、バイオイメージングが生まれた当初から中心となっているのは蛍光顕微鏡である。蛍光顕微鏡の中でも、2光子励起蛍光顕微鏡は、従来の蛍光顕微鏡の長所である低侵襲を保ちつつ、励起光を当てるのに高い空間分解能、時間分解能を有するため、近年特に注目されている

ここで、同じ2光子蛍光顕微鏡において、蛍光シグナルと同時に、蛍光ではないシグナルを同時取得する技術にも注目が集まっている。蛍光ではないシグナルとは、すなわち第二高調波発生（Second Harmonic Generation: SHG）によるものである。

SHGは二つの光子が微小空間中、同時に物質に作用する際、それらの半分の波長を持つ一つの光子へと変換される非線形光学現象で、古くからレーザー等の基盤技術として利用されてきたものである。SHGはどのような物質に光を当てても起こるのではない。SHG起こるためには、光が当たる対象に特異的な構造すなわち非中心対称性の構造が要求される。例えば生体内でコラーゲン繊維などがこの発生条件を満たす。コラーゲンのような特別な構造体におけるSHGイメージングはこれまでに報告されてきた。

SHGイメージングには蛍光イメージングとは異なり、色素が光のエネルギーを吸収し、励起状態の分子が蛍光を放出する過程を必要としない。蛍光顕微鏡では蛍光分子と光との相互作用が有り、必ず途中で分子の励起状態が生成する。また分子の励起状態からは、100%蛍光だけが放出されることはほとんど無く、多くの場合、一重項酸素を発生させる等、周囲の分子に悪影響を与える。すなわち、より強い蛍光シグナルを得て優れた画像を得ようと入射光のエネルギーを上げれば上

げるほど生体へのダメージが増し、それを抑えようとエネルギーを抑えればシグナルも弱くなってしまう。一方、SHGイメージングでは分子による光エネルギーの吸収が起こらないため、生体に有害な一重項酸素発生などは起こらない。更に、2光子顕微鏡による蛍光シグナルを同時取得できる。そのため、生体現象の可視化には理想的なイメージング法と期待されている。

SHGイメージング法でSHGシグナルを得るためには、色素を投与し、観測場を人工的に非対称中心物質にする必要がある。実際、これまで、合成膜染色色素によりSHGシグナルが発生した報告例は多くある。しかしながら、いずれの場合もSHGイメージング法には既存の蛍光色素をそのまま転用されてきた。この場合、SHGシグナルと当時と同じ場所から蛍光シグナルも発生する。これではSHGイメージングの強みを十分に発揮させることはできないため、我々は蛍光を一切放出しないSHGイメージング専用分子の開発に取り掛かった。まず我々は、SHG専用分子は無蛍光性で良いことに気づいた。無蛍光性のSHG専用分子が得られれば、SHGイメージングと同時に、同じ細胞の別の場所に投与した蛍光シグナルと観測することが出来る。我々の開発した分子をテストすると、細胞膜からSHGシグナルが発生するが、蛍光は発生しないことがわかった。

## 2. 研究の目的

従来の蛍光細胞イメージングでは、蛍光色素をターゲット部位に送り込む。一方本研究で開発する分子は、世界初の「無発光性」の細胞イメージングのためのものである。分子を細胞に振りかけると、細胞膜に「非中心対称構造」が構築される。この非中心対称構造は、弱い分子間相互作用で形成されているため、膜近傍のイオン動態の変化でこの構造がゆらぐと思われる。これが第二高調波発生に影響

響し、ゆらぎと同時に SHG 光強度が変化する。つまり方法により、細胞膜の任意の場所で膜電位変化をリアルタイムで観測出来る。蛍光色素を細胞膜に入れて、蛍光強度変化で膜電位変化を見る方法では、シグナル強度の変化は小さく、時間応答性も低い。本研究では SHG イメージング法の最大の長所を活かした分子技術をまず確立させる。この方法は、細胞膜の染色が可能であればどんな細胞にも適用できる。また本研究の分子は無発光であるため、従来の蛍光性分子を細胞内に導入した蛍光イメージングも同時に行える。つまり細胞内の動態は蛍光、細胞膜は SHG 光で、マルチモーダルイメージングが可能となる。

### 3. 研究の方法

一連の膜親和性アゾベンゼン誘導体を合成する。これらは、細胞に投与すると、膜内で非中心対称構造を構築する。そこに SHG 顕微鏡下、チタンサファイアレーザーを光源とする 1000nm のレーザーパルス光を当てると、500nm の SHG 光を発生させることを想定したものだ。本方法は蛍光法とは異なりレーザー照射による一重項酸素等の有害物質の発生は殆どないと考えられる。しかしレーザー強度はできるだけ小さい方が良い。すなわち本研究では、強い SHG 光を出し S/N 比が向上するように置換基変換で分子の構造最適化を行う。

本研究による色素を導入した神経細胞膜を刺激し、人工的に活動電位を発生させ、膜近辺のイオン環境に変化を起こす。すると、細胞膜の外側に挿入された色素分子の弱い構造に揺らぎが生じ、結果として SHG シグナル強度変化がおこるので、それを高い時間分解能でとらえる。

細胞膜からは SHG シグナルを得て、細胞内小器官からは 2 光子蛍光シグナルを得る。すなわち無発光 SHG イメージングと蛍光イメージングのマルチモーダルイメージングによ

る細胞同時観察を成功させる。

### 4. 研究成果

分子基本骨格をアゾベンゼンとした一連のイメージング色素をデザイン・合成した。アゾベンゼンは無蛍光性で、光退色しにくく、更に化学修飾が容易で取り扱いやすい。合成した全ての分子が、有機溶媒中、水溶液中および、人工細胞膜中で無蛍光性であった。さらに、酸素存在下、長時間紫外光照射を行ったところ、各分子は非常に高い光安定性を示し、分解や光反応は検出されなかった。人工細胞膜中に取り込まれると各化合物の吸収帯が短波長シフトし、取り込まれる割合が算出できた。複数の化合物で、細胞導入後 1000 nm パルス光を照射したところ、500 nm の SHG シグナルが細胞膜から観測された。また親水基がアニオン性の化合物では弱い細胞毒性が見られた。以上より、本研究の第一の目的である、無発光色素による、世界初の SHG イメージングの分子基盤技術はほぼ確立されたと言える。

今回の最終目的である SHG イメージング専用色素分子を用いたマルチモーダルイメージングを行った。マルチモーダルイメージングとは、細胞内部のイメージングは従来の蛍光色素を用いて行い、同時に細胞膜のイメージングを SHG シグナルで行うものである。本研究の SHG イメージング色素は、脂質二重膜の外側の層にトラップされ、細胞内部に入り込まない。さらに、無蛍光性であるため、細胞内に取り込ませた蛍光のシグナル検出に対するノイズシグナルを与えることはない。一方で、細胞に取り込ませた蛍光色素からも SHG シグナルは発生しないと思われる。すなわち、同一細胞から互いに干渉しあわない 2 つのシグナルである 2 光子励起による蛍光と SHG シグナルを得ることができるのである。実際、神経細胞の細胞膜外から SHG シグナルを得て、細胞内からは、導入したカ

ルシウムイメージング色素からの蛍光シグナルを、同時に得ることに成功した。さらにこの SHG イメージング色素による SHG シグナル強度が、細胞膜電位に依存して変化することも分かった。以上の成果を報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Nuriya, M.; Fukushima, S.; Momotake, A.; Shinotsuka, T.; Yasui, M.; Arai, T., Multimodal two-photon imaging using a second harmonic generation-specific dye、査読有り、Nat. Commun., 2016, 7, doi:10.1038/ncomms11557.

〔学会発表〕（計 2 件）

- 1) Atsuya Momotake, Haruka Moriyama, Riho Morita, Tatsuo Arai, CONVERSION EFFICIENCY ENHANCEMENT in caged compounds BY PHOTOINDUCED ELECTRON TRANSFER, April 3 - 8, 2016, Osaka City Central Public Hall (Osaka)
- 2) 百武篤也、福嶋瞬、新井達郎、光らないバイオイメージング色素の開発と応用、TIMS 研究交流会、平成 28 年 7 月 1 日、筑波大学（茨城県つくば市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

百武篤也 (MOMOTAKE Atsuya)  
筑波大学・数理物質系・講師  
研究者番号：70375369

### (2) 研究協力者

塗谷睦生 (NURIYA Mutsuo)  
慶応大学・医学部・講師  
研究者番号：60453544