

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：12102

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19056010

研究課題名（和文） 白色レーザーを用いた細胞内生体分子の動的多光子分光イメージング

研究課題名（英文） Dynamic Multi-photon Spectroscopic Imaging of Intracellular Biomolecules Using a White-light Laser Source

## 研究代表者

加納 英明 (KANO HIDEAKI)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：70334240

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、白色レーザー光を用いて、coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)をはじめとする様々な多光子過程を同時に実現する、新しい分光イメージング装置を開発することを目指して研究を遂行した。白色レーザーの持つ幅広いスペクトル帯域を利用することで、CARS過程に加え、第二高調波、第三高調波、そしてマルチプレックス三次和周波も同時測定できることがわかった。これを応用して、テトラモーダル非線形光学イメージング装置の開発を行い、生細胞へと適用した。

## 研究成果の概要（英文）：

In the present project, we extended our CARS work further to obtain CARS and other multi-photon processes simultaneously. Owing to the ultrabroadband spectral profile of the white-light laser source, we developed label-free tetra-modal molecular imaging system for the SH (second harmonics), TH (third harmonics), multiplex TSF and multiplex CARS processes, and applied this technique to a living cell.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,700,000	0	6,700,000
2008年度	6,500,000	0	6,500,000
2009年度	6,500,000	0	6,500,000
2010年度	6,200,000	0	6,200,000
2011年度	5,900,000	0	5,900,000
総計	31,800,000	0	31,800,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：分子分光学・分光イメージング・生細胞

## 1. 研究開始当初の背景

生きた細胞中での化学反応をリアルタイムに追跡することは、分子科学・生命科学双方における究極の目標の一つである。このような視点に基づいて、生細胞内で機能する分子の動的な振る舞いが様々な形で研究されている。このうち最も広く使われている手法は、蛍光タンパク質による蛍光イメージング

である。しかしながら、この手法では試料自身に蛍光タンパク質という異物を導入するため、細胞の本来の姿を忠実に描写しているか否かが深刻な問題となる。生細胞内での分子の真の振る舞いを可視化し、理解するためには、非染色・非侵襲的アプローチが必須であったが、研究開始当初は、そのような戦略を取った研究は非常に少なかった。

## 2. 研究の目的

ラマン分光法は、生きた細胞内の分子分布やそのダイナミクスを、非染色・非破壊で観測することのできる、非常に強力な方法である。特に、ラマンスペクトルを高効率に取得し、高速にイメージングを行う **coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)**顕微鏡は、次世代のラマン顕微鏡として注目を集めている。そこで本研究では、**CARS**をはじめとする様々な多光子過程を同時に実現することを目標として、研究を遂行した。研究期間中に、領域内の研究者との綿密な研究結果の交換により、オルガネラレベルから生体分子レベルまで対象を深く掘り下げ、細胞内、細胞間に生じる化学反応のメカニズムについて、分子レベルで統一的な知見を得ることを目標とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、白色レーザー光という新しい光源を用いた。白色レーザー光の発生には、フォトニック結晶ファイバーという、新しいタイプの非線形光ファイバーを用いた。この光源の導入にあたって、日仏間で緊密な研究協力体制を構築し、本研究で開発する多光子分光イメージング装置に最適な光源の開発を行った。その結果、サブナノ秒マイクロチップレーザーをベースとした光源システム（パルス幅 800 ps, 繰り返し 33 kHz, 出力 300mW）と、カスタムメイドのフォトニック結晶ファイバーを用いた、まったく新しい多光子分光イメージングシステムの構築に成功した。

## 4. 研究成果

研究期間内に、次の3つの成果を上げることになった。

(1) **CARS**による *molecular fingerprinting* 法の開発

白色レーザーの持つ幅広いスペクトル帯域を利用することで、生細胞における分子振動指紋領域の分子分光イメージングに初めて成功した(**CARS molecular fingerprinting**)。本手法により、細胞内の分子分布とその動態を高速に可視化することが可能となった。

(2) テトラモーダル非線形光学イメージング法の開発

システムの測定波長域を近赤外から可視まで拡張したところ、マルチプレックス **CARS** 過程に加え、第二高調波(second harmonics; **SH**)、第三高調波(third harmonics; **TH**)、そしてマルチプレックス三次和周波(third-order sum frequency; **TSF**)も同時測定できることがわかった。出芽酵母生細胞の

**CARS, SH, TH, TSF** テトラモーダル・イメージングを行い、異なる非線形信号間の相関イメージが得られることを示した。

(3) キラル敏感な新しい非線形ラマン分光手法の開発

白色レーザーによる **CARS** 測定を、ラマン光学活性 (Raman optical activity; **ROA**) に応用した。(-)- $\beta$ -pinene を試料として用い、入射偏光と直交する検光子角度にて発生した **CARS** 光を高感度ヘテロダイン検出したところ、キラル由来の **CARS** 信号を世界で初めて観測することに成功した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

(原著論文)

1. **Hiroki Segawa, Masanari Okuno, Hideaki Kano, Philippe Leproux, Vincent Couderc, and \*Hiro-o Hamaguchi**  
"Label-free tetra-modal molecular imaging of living cells with **CARS, SHG, THG** and **TSFG** (coherent anti-Stokes Raman scattering, second harmonic generation, third harmonic generation and third-order sum frequency generation)"査読有  
*Opt. Express* **20**, 9551-9557 (2012).  
DOI 10.1364/OE.20.009551
2. **Kotatsu Bito, Masanari Okuno, Hideaki Kano, Shihomi Tokuhara, Satoru Naito, Yoshinori Masukawa, Philippe Leproux, Vincent Couderc, and \*Hiro-o Hamaguchi,**  
"Protein Secondary Structure Imaging with Ultrabroadband Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (**CARS**) Microspectroscopy"査読有  
*J. Phys. Chem. B* **116**, 1452-1457 (2012)  
DOI 10.1021/jp210914x
3. **\*Philippe Leproux, Vincent Couderc, A. de Angelis, Masanari Okuno, Hideaki Kano, and Hiro-o Hamaguchi,** 査読有  
"New opportunities offered by compact sub-nanosecond supercontinuum sources in ultra-broadbandmultiplex **CARS** microspectroscopy"  
*J. Raman Spectrosc.* **42**, 1871-1874 (2011).  
DOI: 10.1002/jrs.2995
4. **James P. R. Day, Katrin F. Domke, Gianluca Rago, Hideaki Kano, Hiro-o Hamaguchi, Erik M. Vartiainen, and \*Mischa Bonn**  
"Quantitative Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (**CARS**) Microscopy"査読有

- J. Phys. Chem. B **115**, 7713–7725 (2011).  
DOI: 10.1021/jp200606e
5. Masanari Okuno, \*Hideaki Kano, Philippe Leproux, Vincent Couderc, James Day, Mischa Bonn, and \*Hiro-o Hamaguchi  
“Quantitative CARS molecular fingerprinting of single living cells with the use of the maximum entropy method” 査読有  
Angew. Chem. Int. Ed. **49**, 6773-6777 (2010).  
DOI: 10.1002/anie.201001560
  6. \*Hideaki Kano  
“Molecular Spectroscopic Imaging Using a White-Light Laser Source” 査読有  
Bull. Chem. Soc. Jpn **83**, 735-743 (2010).  
DOI: 10.1246/bcsj.20100004
  7. \*Hideaki Kano  
“Molecular Vibrational Imaging of a Human Cell by Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microspectroscopy Using a Supercontinuum Light Source” 査読有  
J. Raman Spectrosc. **39** (11), 1649-1652 (2008).  
DOI: 10.1002/jrs.2041
  8. Rintaro Shimada, Hideaki Kano, and \*Hiro-o Hamaguchi, and Hiro-o Hamaguchi,  
“Intensity enhancement and selective detection of proximate solvent molecules by molecular near-field effect in resonance hyper-Raman scattering” 査読有  
J. Chem. Phys. **129**, 024505 (2008).  
DOI: 10.1063/1.2950092
  9. Masanari Okuno, Hideaki Kano, Philippe Leproux, Vincent Couderc, and \*Hiro-o Hamaguchi,  
“Ultrabroadband multiplex CARS microspectroscopy and imaging using a subnanosecond supercontinuum light source in the deep near infrared” 査読有  
Opt. Lett. **33**, 923-925 (2008).  
DOI: 10.1364/OL.33.000923
  10. \*Hideaki Kano and Hiro-o Hamaguchi  
“Coherent Raman Imaging of Human Living Cells Using a Supercontinuum Light Source” 査読有  
Jpn. J. Appl. Phys. **46**, 6875-6877 (2007).  
DOI: 10.1143/JJAP.46.6875
  11. Hideaki Kano and \*Hiro-o Hamaguchi,  
“Supercontinuum Dynamically Visualizes a Dividing Single Cell” 査読有  
Anal. Chem. **79**, 8967-8973 (2007).  
DOI: 10.1021/ac071416z
  12. Masanari Okuno, Hideaki Kano, Philippe Leproux, Vincent Couderc, and \*Hiro-o Hamaguchi  
“Ultrabroadband (>2000 cm<sup>-1</sup>) Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Spectroscopy Using a Sub-Nanosecond Supercontinuum Light Source” 査読有  
Opt. Lett. **32**, 3050-3052 (2007).  
DOI: 10.1364/OL.32.003050
- (総説)
13. 加納 英明、奥野 将成、濱口 宏夫  
“白色レーザーを用いた生細胞イメージング”  
表面科学 **32**, 792-796 (2011).  
DOI: 10.1380/jsssj.32.792
  14. 加納 英明、奥野 将成、濱口 宏夫  
“脂質分子を“ありのまま”にとらえるー白色レーザーを用いた脂質分子の CARS 分光イメージングー”  
実験医学, **28**(8), 1234-1240 (2010)  
<http://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/boo k/9784758100595/>
  15. 加納 英明、奥野 将成、濱口 宏夫  
“ナノ秒白色レーザーを用いたコヒーレント・ラマン分光イメージング”  
レーザー研究, **37**(10), 739-745 (2009)  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/10025517333>
  16. 加納 英明、濱口 宏夫  
“コヒーレントラマン分光イメージング”  
オプトロニクス **8**月号(332), 108-114 (2009)  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40016736353>
  17. 奥野 将成、加納 英明、濱口 宏夫  
“生細胞のラマン分光イメージング ～生命の分子レベル時空間解析に向けて～”  
遺伝, **63**(3), 80-84 (2009)  
<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/200902290299217302>
  18. \*加納英明  
“白色レーザーを用いた非線形ラマン分光イメージング”  
分光研究, **57** (5) 215-217 (2008).  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/10021874433>
  19. \*加納英明、濱口宏夫 (章著)  
“非線形ラマン分光イメージング”

ぶんせき, **402**, 270-277 (2008).  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/10025214291>

[図書] (計 3 件)

- 1) Hideaki Kano, Yu-San Huang, Yasuaki Naito, Rintaro Shimada, and Hiro-o Hamaguchi (章著)  
" Linear and Non-Linear Raman Microspectroscopy –from a Molecule to Single Living Cells -"  
Raman, Infrared, and Near-infrared chemical imaging, S. Sasic and Y. Ozaki Ed. eds., (Wiley, 2010), pp. 301-312.  
<http://as.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-047038204X.html>
- 2) Hideaki Kano, Yu-San Huang, Yasuaki Naito, and Hiro-o Hamaguchi (章著)  
" Linear and Non-Linear Raman Microspectroscopy and Imaging of Single Living Cells "  
Nao Biophotonics, Hiroshi Masuhara, Satoshi Kawata, Fumio Tokunaga eds., (Elsevier, 2007), Vol. 3, pp. 43-56.  
<http://www.sciencedirect.com/science/bookseries/15740641>
- 3) 安藤正浩, 内藤康彰, 加納英明, 濱口宏夫 (章著)  
“ラマン顕微分光法 ～生細胞を分子レベルで観る～”  
実験医学別冊, “生命科学のための機器分析実験ハンドブック” 74-79 (2007).  
<http://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758101691/>

[学会発表] (計 30 件)

- 1) Hideaki Kano, Masanari Okuno, and Hiro-o Hamaguchi (Invited)  
" CARS molecular fingerprinting using a white-light laser source",  
The 22nd International Conference on Raman Spectroscopy,  
(Boston, U.S.A., August 8-13 (2010).
- 2) Hideaki Kano, Masanari Okuno, and Hiro-o Hamaguchi (Invited)  
" Label-free, multi-colour, high-speed imaging of a living cell by CARS spectral imaging",  
Laser Application in Life Sciences Conference (LALS-2010)  
(Oulu, Finland, June 9-11 (2010).
- 3) Hideaki Kano (Pleanry)  
"CARS spectroscopic imaging using a white-light laser source",  
5th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS-5)  
(Melbourne, Australia, July 12-17, 2009).

- 4) Hideaki Kano and Hiro-o Hamaguchi (Invited)  
"CARS Spectroscopic Imaging Using a Supercontinuum Laser Source "  
International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2008)  
(Uxbridge, UK, August 17-22, 2008)
- 5) Hideaki Kano and Hiro-o Hamaguchi (Invited)  
"COHERENT RAMAN BIOIMAGING USING A SUPERCONTINUUM LIGHT SOURCE "  
International Symposium, TOPICAL PROBLEMS OF BIOPHOTONICS 2007  
(Moscow, Russia, August 4-11, 2007)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 非線形分光計測システム用の光源装置, 非線形分光計測システム及び方法  
発明者: 加納英明・濱口 宏夫  
権利者: 東京大学  
種類: 特願  
番号: 2008-66832  
出願年月日: 2008 年 3 月 14 日  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 英明 (KANO HIDEAKI)  
筑波大学・数理物質系・准教授  
研究者番号: 70334240