

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13931

研究課題名(和文)細胞内励起状態の視覚化を目指すレーザー粒子とレーザー発振顕微鏡の開発

研究課題名(英文)Development of lasing beads and microscopy to visualize intracellular excited states

研究代表者

金 水縁 (KIM, Sooyeon)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：50758886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、(1)ウイスパリング・ギャレリー・モードレーザーの原理を利用したレーザー粒子開発、(2)レーザー粒子に応用可能な新規蛍光物質開発および(3)新規顕微鏡法に関する研究を行った。その結果、ターゲットたんぱく質が存在する際、励起強度増大に伴い、蛍光強度の差が増大することが分かった(本実験系において29倍増大)。また、自己集合体の形成により活性酸素の生成および検知が可能な新規蛍光物質を開発した。得られた結果から、今後、非発光性のターゲット物質の励起状態ダイナミクスを観察できるシステムを構築する上、重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：During this project, I developed (1) a sensor design that maximizes a fluorescence contrast inspired by whispering-gallery mode lasing (WGM), (2) fluorescence molecules that generate and detect reactive oxygen species, and (3) new microscopy technique based on WGM. First of all, fluorophore-aptamer-modified glass microspheres (cf. 1-38 μm) successfully detected a target protein, thrombin, in an excitation-power dependent manner (29-fold enhanced at 3400 μW). Next, we newly developed BODIPY and anthracene dyads that generate and detect reactive oxygen species. Based on these findings, various important insights for developing 'lasing microscopy' to visualize intracellular excited states have been obtained.

研究分野：Photochemistry

キーワード：蛍光信号増幅 蛍光センサー レーザー 顕微鏡 蛍光プローブ 自己集合体

1. 研究開始当初の背景

2011年米国のYunグループは、細胞内の蛍光タンパク質を使用し、細胞を媒質としたレーザーの開発に世界最初で成功した(M. C. Gather, S. H. Yun. *Nat. Photonics* (2011) 5, 406.)。緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現させた細胞を2層のダイクロイックミラーで作ったサンドイッチチャンバーの間に入れ、ナノ秒パルスレーザーで励起すると、GFPをレーザー媒質とした光増幅が行われ、レーザーが発振する。さらに、2015年、ダイクロイックミラーチャンバーを使わず、細胞質($n = 1.37$)より屈折率が大きい粒子(例: BaTiO_3 , $n = 1.96$)にレーザー色素をドーピングし、細胞内でwhispering-gallery mode(WGモード)の光増幅過程を介したレーザー発振の例が報告された(M. Humar, S. H. Yun. *Nat. Photonics* (2015) 9, 572; M. Schubert, M. C. Gather et al. *Nano Lett.* (2015) 15, 5647)。

研究開始当時(2016年)、Yunグループを中心に「細胞レーザー」に関する研究が行われてきたが、彼らの研究は生体基盤の発光体への応用に絞られている。本研究では、これまでの文献と本人の研究結果を踏まえ、標的物質の存在および励起状態ダイナミクスをレーザーレベルの強力な信号で2次元視覚化できるレーザー粒子の開発を目指している。このような試みは世界最初であり、今後の様々なセンサー開発および過渡吸収顕微鏡法の構築を導く先導的な研究である。

本申請者は、市販および独自に開発した様々な蛍光色素を用いて細胞内で生成される活性酸素の発生を視覚化する研究を進めてきた(S. Kim et al. *J. Am. Chem. Soc.* (2014) 136, 11707など)。そこで、近年報告された粒子(M. Humar, S. H. Yun. *Nat. Photonics* (2015) 9, 572; M. Schubert, M. C. Gather et al. *Nano Lett.* (2015) 15, 5647)に本申請者が開発した蛍光色素を融合すると、細胞内に存在する低分子や気体分子(活性酸素、窒素酸化物、 H_2S など)をかつてなく高いS/N比の信号で検出できる「レーザー発振型の超発光性センサー粒子(以下、レーザー粒子)」を簡単な手法で制作できるという着想に至った。

一方、細胞内で存在する標的物質の励起状態を調べるため、主に時間分解蛍光測定が使われている。一方、非発光性発色団の励起状態ダイナミクスを測定する最も一般的な手法としてポンプ-プローブ法による過渡吸収測定が挙げられるが、細胞内で生じる励起状態の過渡吸収を視覚化した例は今まで報告されていない。その理由は、ポンプ光によって生成した励起状態の分子が吸収するプローブ光の強度が、一細胞レベルで観察する際、極めて小さいためである。ここから導き出されることは、励起状態の生成と失活による信号変化を大幅に増幅させることが、一細胞レベルでの励起状態ダイナミクスの観測を行

うための顕微鏡開発への大前提である。本研究で提案するレーザー粒子を使用すれば、細胞内に存在する非発光性の発色団の励起状態の寿命に対応するレーザー発振を約ナノ秒の時間分解能かつ2次元イメージで視覚化できる。

2. 研究の目的

本研究計画では、レーザー発振型の超発光性センサー粒子(以下、レーザー粒子)を利用し、

(1)人体のように非均一的で厚みのある組織でも明確にターゲット物質を検出

(2)非発光性のターゲット物質の励起状態ダイナミクスを観察できるシステムの構築を目的とした。

まず、我々が独自に開発した蛍光プローブを多孔質粒子にドーピングし、高感度かつ光増幅による高S/N比を持つレーザー粒子の開発を行う。続いて、ポンプ-プローブ法と粒子内での光増幅原理を融合した「レーザー顕微鏡法」を開発し、励起状態ダイナミクスの視覚化を目指した。

3. 研究の方法

本研究課題では、(1-1) WGモードレーザーの原理を利用したレーザー粒子開発、(1-2)レーザー粒子に応用可能な新規発光物質の開発、(2)新規顕微鏡法に関する研究を行った。

(1-1) レーザー粒子は、1~38 μm ガラス微小球の表面に蛍光色素が修飾されたDNAアプタマーをドーブすることによって合成した(図1)。その後、ピコ秒およびフェムト秒パルスレーザーが搭載された顕微鏡を用い、粒子の蛍光強度およびスペクトルを測定した。

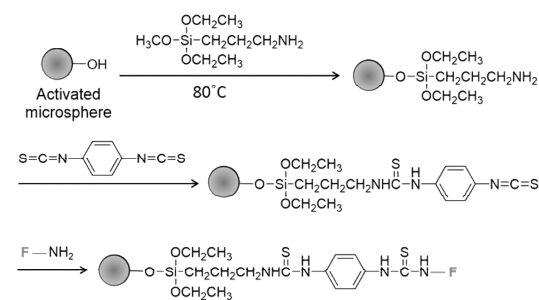


図1. ガラス微小球を利用したレーザー粒子の合成法

(1-2) 開発したレーザー粒子に応用できる新規発光物質として、自己集合体の形成により活性酸素を生成および検知するBODIPY由来の蛍光色素(図2)を開発した。

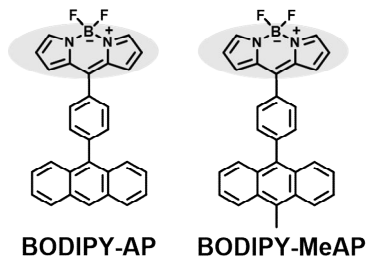


図 2. 本研究で開発した活性酸素を生成および検知する新規色素の化学構造

(2) レーザー発振顕微鏡法を実現するため、ナノ秒パルスレーザーを共焦点顕微鏡に搭載した。

4. 研究成果

本研究課題で得られた主な成果は以下のとおりである。

(1-1) WG モードレーザーの原理を利用したレーザー粒子開発

図 1 の手法によって合成したレーザー粒子を用い、高感度かつ光増幅による高 S/N 比で特定のたんぱく質を検知できるかについて調べた。一般的なレーザーとは、励起源からレーザー媒質へエネルギーを供給し、光が二枚のミラー間において反射を繰り返し、一定レベルを超えるとレーザー光として放出される原理のことを指す。そこで、本研究の鍵となる WG モードとは、共振器として二枚のミラーの代わりにガラス微小球のような球形の共振器を利用する。微小球内外の屈折率の差により、入射した光が微小球内部で全反射を繰り返し、光増幅することができる。蛍光色素としては、高い光安定性と蛍光量子収率 (>0.9) を示す BODIPY および Alexa fluoro 488 (A488) を選んだ。

まず、本研究で使用しているガラス微小球を用いて WG モード共鳴が生じるかについて検討した。そこで、色素ドープ微小球である A488-ガラス微小球を超純水中に分散させ、A488-ガラス微小球はフェムト秒レーザーを用い波長 405 nm で励起し、微小球からの蛍光強度およびスペクトルを観察した。その結果、ガラス微小球の縁が発光し、発光部分を励起すると共鳴線が現れた蛍光スペクトルが得られた (図 3a)。さらに、A488-ガラス微小球のサイズと共鳴線の間隔 ($\Delta\lambda_m$) が反比例することから、共鳴スペクトルが WG モード共鳴によることが証明された (図 3b)。

そして、特定のタンパク質および化合物に特異的に結合できる DNA アプタマーをドープし、超発光性センサー粒子を開発した。モデルタンパク質のトロンピンを選び、トロンピンと特異的に結合する Thrombin binding aptamer (TBA) ($5'$ -GGTTGGTGTGGTTGG- $3'$, $K_d \sim 100$ nM) を用いることとした。TBA はカリウムイオン存在下で G-quadruplex と呼ばれる特異的な構造をとる。G-quadruplex とは、グアニン 4 つが水素結合を介して平面構造を

形成し、2 つ以上重なった構造である。これらのガラス微小球および DNA アプタマーを組み合わせてセンサーを開発することとした。そのストラテジーを 2 つ挙げる。1 つ目は、一本鎖の TBA (ss-TBA) を微小球に修飾し、色素標識したトロンピンをバインディングすることによって微小球が発光を示すというスキームである (図 4a)。2 つ目は色素を標識した二本鎖の TBA (ds-TBA) にトロンピンを添加し、色素が標識された TBA の相補鎖が脱離し、結果として消光するというスキームである (図 4b)。

2 つのデザインを比較した結果、ss-TBA は微小球周辺での発光媒質 (色素標識したトロンピン) の密度が低く、光増幅現象が観測されなかったが、ds-TBA では励起光の強度により蛍光信号の差が増加されることを確認した。詳しくは、0.1 mg ds-TBA-微小球, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris HCl (pH 8.0) 条件下で、種々のトロンピン濃度 (0, 1, 10, 100, 1000 nM) で 37°C, 1 時間攪拌した後、広視野顕微鏡 (励起波長: 488 nm, 励起強度: 13, 1300, 3400 μ W) によって観察した。図 4c で示したように、13 μ W の時の蛍光強度差を 1.0 とすると、1300, 3400 μ W のとき 4.1, 29 倍に増大した。よって、励起強度増大に伴い、蛍光強度の差が増大することが分かった。

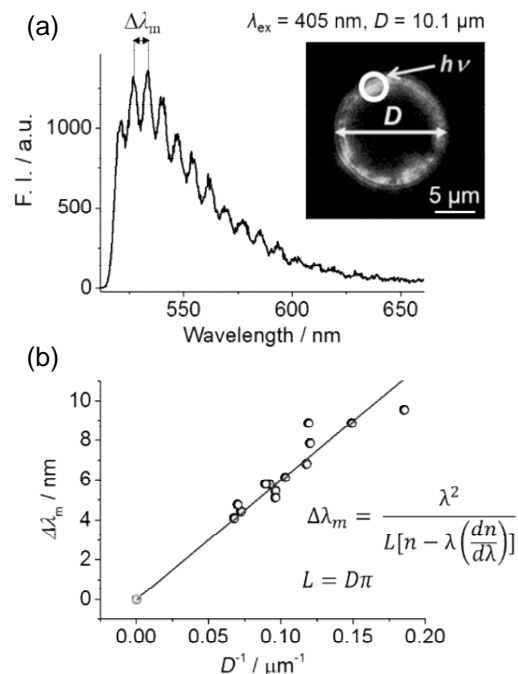


図 3. (a)A488 がドープされたガラス微小球から得られた蛍光スペクトルと蛍光顕微鏡写真。(b)A488-ガラス微小球のサイズと共鳴線の間隔 ($\Delta\lambda_m$) の相関関係。WGM 共鳴によるスペクトルの分裂と球形共振器の大きさの相関式によって fitting した結果を直線で示した。

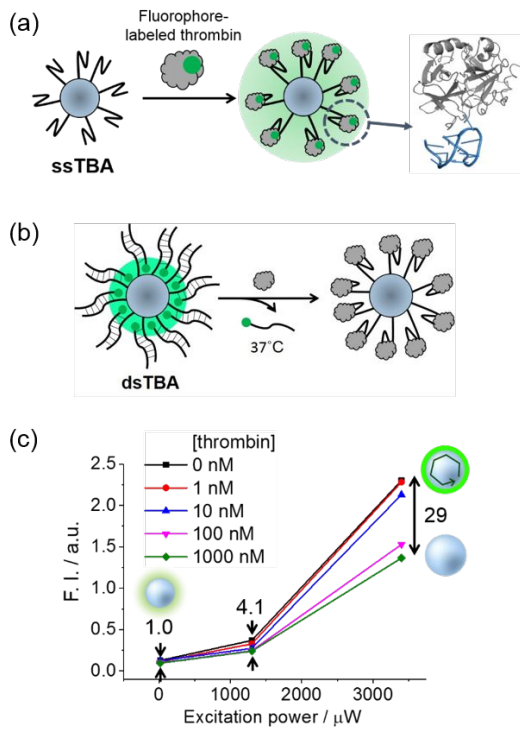


図4 .ガラス微小球および DNA アプタマーを組み合わせてセンサーのデザイン：(a) トロンビンと結合により蛍光強度が増加する ss-TBA, (b) トロンビンと結合により蛍光強度が低下する ds-TBA。 (c) ds-TBA による蛍光強度の差の増幅。

(1-2) レーザー粒子に応用可能な新規発光物質の開発

活性酸素種の一つである一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) に着目し、 $^1\text{O}_2$ を検出および生成する新規蛍光色素を開発した(図 2)。

水中、BODIPY-AP および BODIPY-MeAP 分子(図 2)は自己集合体を形成することによって、BODIPY 由来の緑色蛍光の他、BODIPY とアントラセン部位の電荷移動状態による赤色発光が観測された(図 5a)。そこで、BODIPY の吸収帯を選択的に励起させると (511 ~ 551 nm, 32 mW cm^{-2}) $^1\text{O}_2$ が発生し、アントラセン部位を自己酸化させることがわかった。アントラセンの酸化によって生成されるエンドペロキシドは自己集合体を形成できないため、電荷移動状態からの赤色発光が消光される(図 5b, c)。 $^1\text{O}_2$ の発生や赤色発光といった本現象は、自己集合体が形成できる水中、又は、低い極性を持つ 1,4-dioxane では観測できたが、より低い極性をもつ cyclohexane と高い極性のメタノールの中では起きなかった。

したがって、本研究で開発された BODIPY-AP、BODIPY-MeAP をレーザー粒子に導入すると、 $^1\text{O}_2$ および溶媒極性の高感度検知に応用できると期待される。また、照射により活性酸素を生成できる無機材料の開発も同時に行い、今後、様々な実験系においてレーザー粒子による活性酸素検出する

ことを目標としている。

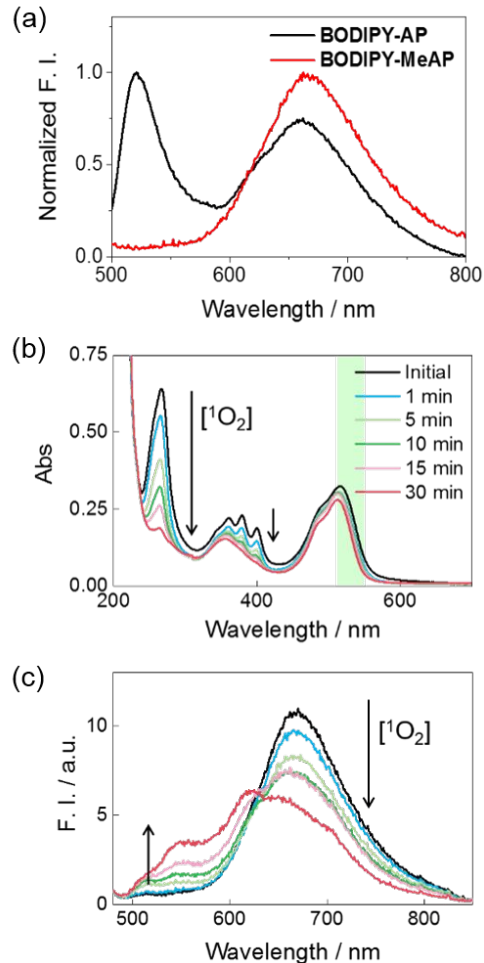


図 5. (a) 水中での BODIPY-AP と BODIPY-MeAP の蛍光スペクトル。光照射による BODIPY-MeAP の吸収スペクトル(b)および蛍光スペクトル(c)の変化。アントラセン部位の吸収バンドが特異的に減少したことから(図 5b、矢印)、 $^1\text{O}_2$ の生成による自己酸化家庭であることがわかった。

(2)非発光性のターゲット物質の励起状態ダイナミクスを観察できる顕微鏡システムの構築

予備実験として、アミノ基 (-NH₂) が表面に修飾されている市販のポリスチレン粒子にアミノ基と選択的な反応性を有する NHS エステル基が修飾されている pH 応答性蛍光プローブ (SNARF1) をドープし、pH 変化によって異なるレーザー発振を示すのか調べた。その結果、SNARF1 の蛍光スペクトル変化 (580 ~ 640 nm) は成功的に観測できたが、レーザー発振を意味する蛍光スペクトルの幅の減少は観測できなかった。したがって、現在の粒子デザインと顕微鏡装置ではレーザー発振が難しいことがわかった。その理由として、当時、我々の共焦点顕微鏡に搭載されているピコ秒レーザーの低出力 (< 1 μJ/pulse) と粒子の低いドープ量が挙げられる。以上の実験から、微小球の光増幅を引き起

こすためには、最低‘数十 μ J/pulse’以上の出力を持つ光源を導入する必要が示唆された。したがって、平成28年度に、532-nm ナノ秒レーザーを購入し、共焦点顕微鏡装置に搭載および最適化作業を行った。本研究成果(1-1)と(1-2)で得られた知見をもとに、非発光性のターゲット物質の励起状態ダイナミクスを観察できる顕微鏡システムの実現に向けて顕微鏡装置の最適化を行っている。

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 13 件)

1. Sooyeon Kim, Ayaka Kuroda, Mamoru Fujitsuka, Tetsuro Majima, Amplifying fluorescence signal contrast of aptamer-modified microspheres inspired by whispering-gallery mode lasing, RSC Advances, 調査有, (2018) DOI: 10.1039/c8ra03192d.
2. Jiawei Xue, Ossama Elbanna, Sooyeon Kim, Mamoru Fujitsuka, Tetsuro Majima, Defect State-Induced Efficient Hot Electron Transfer in Au Nanoparticles/Reduced TiO₂ Mesocrystal Photocatalysts, Chemical Communications, 調査有, (2018) DOI: 10.1039/C8CC02853B.
3. Xiaowei Shi, Mamoru Fujitsuka, Sooyeon Kim, Tetsuro Majima, Faster Electron Injection and More Active Sites for Efficient Photocatalytic H₂ Evolution in g-C₃N₄/MoS₂ Hybrid, Small, 調査有, Vol. 14, 1703277 (2018).
4. Zaizhu Lou, Sooyeon Kim, Tetsuro Majima et al. (計 6 名、2 番目), Anisotropic Ag₂S-Au Triangular Nanoprisms with Desired Configuration for Plasmonic Photocatalytic Hydrogen Generation in Visible/Near-Infrared Region, Advanced Functional Materials, 調査有, Vol. 28, 1706969 (2018).
5. Xiaoyan Cai, Sooyeon Kim, Tetsuro Majima et al. (計 8 名、5 番目), Au Nanorod Photosensitized La₂Ti₂O₇ Nanosteps: Successive Surface Heterojunctions Boosting Visible to Near-Infrared Photocatalytic H₂ Evolution, ACS Catalysis, 調査有, Vol. 8, 122 (2018).
6. Sooyeon Kim, Yang Zhou, Tetsuro Majima et al. (計 8 名、1 番目), Aggregation-Induced Singlet Oxygen Generation: Functional Fluorophore and Anthrylphenylene Dyad Self-Assemblies, Chemistry-A European Journal, 調査有, Vol. 24, 636 (2018).
7. Mingshan Zhu, Sooyeon Kim, Tetsuro Majima et al. (計 7 名、2 番目), Metal-Free Photocatalyst for H₂ Evolution in Visible to Near-Infrared Region: Black Phosphorus/Graphitic Carbon Nitride, Journal of the American Chemical Society, 調査有, Vol. 139, 13234 (2017).
8. Mingshan Zhu, Yasuko Osakada, Sooyeon Kim, Mamoru Fujitsuka, Tetsuro Majima, Black phosphorus: A promising two dimensional visible

and near-infrared-activated photocatalyst for hydrogen evolution, Applied Catalysis B: Environmental, 調査有, Vol. 217, 285 (2017).

9. Peng Zhang, Sooyeon Kim, Mamoru Fujitsuka, Tetsuro Majima, Controllable nanothorns on TiO₂ mesocrystals for efficient charge separation in hydrogen evolution, Chemical Communications, 調査有, Vol. 53, 5306 (2017).
10. Ossama Elbanna, Sooyeon Kim, Mamoru Fujitsuka, Tetsuro Majima, TiO₂ Mesocrystals Composed with Gold Nanorods for Highly Efficient Visible-NIR-Photocatalytic Hydrogen Production, Nano energy, 調査有, Vol. 35, 1 (2017).

11. Gun-Hee Moon, Sooyeon Kim, Tetsuro Majima et al. (計 6 名、3 番目), Eco-Friendly Photochemical Production of H₂O₂ through O₂ Reduction over Carbon Nitride Frameworks Incorporated with Multiple Hetero-Elements, ACS Catalysis, 調査有, Vol. 7, 2886 (2017).

12. Zaizhu Lou, Sooyeon Kim, T. Majima et al. (計 6 名、2 番目), In-Situ Observation of Single Au Triangular Nanoprism Etching to Various Shapes for Plasmonic Photocatalytic Hydrogen Generation, ACS Nano, 調査有, Vol. 11, 968 (2017).

13. Elke Debroye, Sooyeon Kim, Maarten Roeloffs et al. (計 8 名、6 番目), Facet-Dependent Photoreduction on Single ZnO Crystals, Journal of Physical Chemistry Letters, 調査有, Vol. 8, 340 (2017).

14. 金水縁、藤塚守、真嶋哲朗、光線力学療法で発生する一重項酸素の視覚化のための蛍光プローブ Si-DMA の開発、ドージンニュース, 調査有, 159 (2016).

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Sooyeon Kim, Yang Zhou, Mamoru Fujitsuka, Mikiji Miyata, Tetsuro Majima, Aggregation-Induced Singlet Oxygen Generation using Functional Aggregates of Fluorophore and Anthrylphenylene Dyads, 日本化学会第 98 春季年会、日本大学理工学部 船橋キャンパス、2018 年 3 月 20 日.
2. Sooyeon Kim, Functional Aggregates of Fluorophore and Anthrylphenylene dyads, 13th Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience-2017, Inha University (Incheon, Korea), 2017 年 10 月 27 日.
3. Sooyeon Kim, Yang Zhou, Norimitsu Tohnai, Mamoru Fujitsuka, Mikiji Miyata, Tetsuro Majima, Aggregation-Induced Singlet Oxygen Generation of Fluorophore and Anthrylphenylene Dyads, 2017 年光化学討論会、東北大学青葉山キャンパス、2017 年 9 月 6 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：自己集合体形成化合物及び該化合物を含む一重項酸素産生剤

発明者：真嶋哲朗、金水縁、藤塚守、宮田幹

二

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許

番号：特許願 2017-164826 号

出願年月日：2017 年 8 月 29 日

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 水縁 (KIM, Sooyeon)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教

研究者番号：5 0 7 5 8 8 8 6

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()