

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20360033

研究課題名(和文) 生体分子キラリティ可視化のための非線形光学顕微鏡

研究課題名(英文) Nonlinear-optical microscopy for visualizing chiral structures in biological molecules

研究代表者

伊東 一良 (ITO KAZUYOSHI)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：80113520

研究成果の概要(和文)：

非線形光学過程における電子共鳴、分子振動共鳴などの効果を駆使する、新しい顕微イメージング手法を創出することに成功した。具体的には、超短パルスレーザーを用い、(a) 誘導パラメトリック発光顕微鏡を用いた赤血球や花弁における二光子吸収の可視化手法、(b) 誘導ラマン散乱を用いた分子振動のバックグラウンドフリーイメージング手法を実証した。

研究成果の概要(英文)：

We have developed new optical microscopic imaging techniques which exploit the electronic and vibrational resonances in nonlinear-optical processes. Specifically, we demonstrated (a) the visualization of two-photon absorption resonances in red blood cells and plant petal cells based on stimulated parametric emission microscopy, and (b) background-free imaging of molecular vibrations based on stimulated Raman scattering microscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎、応用光学・量子光工学

キーワード：光計測、光学顕微鏡、超短光パルス、非線形光学効果

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代に入り、生命機能の物質的基盤であるタンパク質の機能とその発現メカニズム、タンパク質分子間の相互作用、ネットワークの解析に関する研究が注目を集めている。特に、生きた細胞中での動態を解明することが強く求められている。

このような観点から、様々な顕微分光手法の開発とその生体解析への応用が試みられている。特に、非線形光学過程を活用する非線形光学顕微鏡は、高感度かつ無標識での観

察を可能とすることから、近年盛んに研究がなされている。これまでに、第二次高調波発生、第三次高調波発生、コヒーレント反ストークスラマン散乱など、様々な非線形光学過程が非線形光学顕微鏡に応用されている。以上の背景を鑑みると、これまで用いられてこなかった非線形光学効果を適用することで、新しい生体解析手法を実現できればそのインパクトは大きい。

本研究における解析対象として、我々が当初注目したのは分子のキラリティである。生

体分子の機能の多くはタンパク質の立体構造変化により生み出されており、その解析手法の開発が強く望まれている。従来からの立体構造解析の手法には、X線回折法、核磁気共鳴法、円二色性法等が挙げられるが、いずれも、生きたままの細胞内のタンパク質のコンフォメーション変化の観察を可能とするものではない。

一方、非線形光学過程を用いるキラリティ検出法が、最近注目を集めている。例えば、カリフォルニア大学の Shen らは、非線形光学効果のひとつである和周波発生を用いてキラリティの検出が可能であることを報告している。この手法は、バックグラウンドフリーの高感度な信号検出が可能という特長を持つ。しかし、(a) 空間分解能が低い、(b) 非常にエネルギーの高い(~1 mJ)光パルスの使用が必須、(c) 信号を増強するために信号光波長を試料の吸収共鳴に合わせる必要があり、発生した信号光が吸収されやすい、という問題があるため、このままで生細胞観察には使用できない。

2. 研究の目的

本研究では、生細胞中のタンパク質の立体構造変化を捉える新しい観察手法を実現することを目的とした。具体的には、我々が開発してきた、誘導パラメトリック発光 (stimulated parametric emission, SPE) 顕微鏡を用いる。SPE 顕微鏡に対して、精密な偏光制御を行うことで、生細胞内の高分解能キラリティ可視化技術を開発することを目指した。

3. 研究の方法

(1) キラリティ可視化手法の検討

当初我々が有していたアイデアは以下のようなものである。2色のレーザービームの偏光を、互いに直交する円偏光として試料に集光照射することにより、キラリティを持つ物質のみから SPE 信号光 (四光波混合光) を発生させることが可能である。これにより、四光波混合を用いてバックグラウンドフリーの高感度なキラリティ検出が可能となり、SPE の特徴である、透明波長帯での信号検出というメリットが得られる。

上記手法を実証するため、異なる周波数をもつ2つのパルスを、直交円偏波関係を以って高 NA レンズに入射し、集光点において非線形光学効果を生じさせた。そして、バビネソレイユ偏光板を用いて偏光を精密に制御することを試みたが、アキラな試料であるガラスや水に対しても SPE 信号が十分に抑圧されないことがわかった。この原因を調査したところ、偏光の制御精度が不足しているためであることが判明した。

(2) 新しい非線形光学過程を用いた非線形光

学顕微法の探索

これまで用いられてこなかった非線形光学効果を活用する、新しい非線形光学顕微法を創出するよう、研究の方向性をシフトさせた。具体的には、SPE 顕微鏡による赤血球や花卉組織の二光子電子共鳴検出の実証、分子振動をバックグラウンドフリーで検出する誘導ラマン散乱顕微鏡の実証を行った。

4. 研究成果

(1) SPE 顕微鏡による二光子共鳴の可視化

SPE 顕微鏡では、波長 800 nm、時間幅<8 fs の超短パルスレーザーを顕微鏡に導入し、集光点において四光波混合効果を生じさせた後、光フィルタによって SPE 信号を抽出し、光電子増倍管によって検出する。SPE 信号は、励起光の二光子準位である 400 nm 帯において試料が吸収をもつときに増強されると期待される。しかしながら、この効果が無染色生体試料で現れるかどうかは実証できていなかった。そこで、SPE 顕微鏡により鶏の赤血球を観察したところ、赤血球内部において強い SPE 信号が観察された (図 1(a)) [6]。これはヘモグロビンが有するソーレー帯の吸収を反映したものと考えられる。従来のヘモグロビン可視化手法として、エタノール固定後、紫外線照射によって発生する蛍光を検出する方式が知られているが、SPE 顕微鏡を用いることで、このような固定操作を行うことなく、ヘモグロビンを可視化できる。また、SPE 顕微鏡を用いてエタノール固定前後の赤血球を観察したところ、赤血球の様態が大きく変化してしまうこともわかった。このような様態変化を生じさせない上でも、SPE 顕微鏡による無染色観察は有効であるといえる。

また、ペチュニアの花弁組織を観察したところ、細胞質のみが強く光ることがわかった [3]。このコントラスト源を調査するため、花弁から色素を抽出し、紫外・可視吸収スペクトルを測定した。その結果、400 nm 付近から短波長側に強い紫外吸収があることがわかり、これが SPE 像のコントラストを生んだと考えられる。

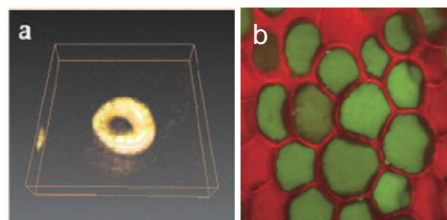


図 1. SPE 顕微鏡による二光子電子共鳴の可視化例。(a)マウス赤血球。観察領域：15 x 15 x 3 μm 。(b) ペチュニア花卉。観察領域：80 x 80 μm 。緑：短波長 SPE 信号。赤：長波長 SPE 信号。

以上の結果から、SPE 顕微鏡が無染色生体における色素の可視化に応用可能であることを実証することができた。

(2) 誘導ラマン散乱顕微鏡の実証

誘導ラマン散乱(SRS)を用いる新規顕微鏡の着想に至った[8]。SRSは2色の光パルスと物質との非線形相互作用により、一方のパルスのエネルギーが他方のパルスに移る現象である。SRSはラマン共鳴のみを反映し、非共鳴相互作用に影響されないため、高コントラストなラマン顕微鏡を実現できると考えられる。特に、コヒーレント反ストークスラマン散乱(CARS)顕微鏡において非共鳴相互作用の存在は大きな課題であった。SRSを顕微鏡に適用することでCARSの課題をクリアできると考えた。

我々は、SRS顕微鏡が原理的に高感度かつ高コントラストを有する強力な新規顕微鏡手法になりうることを提案し、生体観察の実証実験に成功した。実験系を図2に示す。チタンサファイアレーザーと光パラメトリック発振器から発生する2色のパルスを用いた。後者に対して音響光学変調器により10 MHzの強度変調を施した。その後、両パルスを合波し、試料に集光する。集光点でSRSが発生すると、強度変調が他方のパルスに転写される。この強度変調成分をロックイン検出することで、SRS信号を得る。図3にタバコBY2細胞のSRS像を示す。光パルスの差周波を 2900 cm^{-1} に設定し、CH伸縮振動モードを可視化している。細胞壁や核などを高いコントラストで可視化することができた。

さらに、このシステムの感度を測定したところ、理論限界感度まで $<15\text{ dB}$ に迫る高感度性を有することを確認できた。これによって、SRS顕微鏡の高感度性を定量的に実証した。また、ロックイン周波数を38 MHzまで高めることで、理論限界感度を達成することにも成功した[1]。

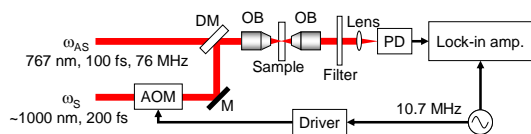


図2. SRS顕微鏡の実験構成図。

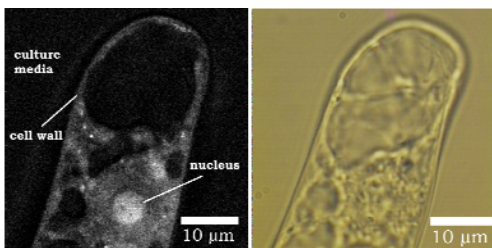


図3. 左:タバコBY2細胞のSRS像。右:透過像。

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9件)

- [1] Y. Ozeki, Y. Kitagawa, K. Sumimura, N. Nishizawa, W. Umemura, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, “Stimulated Raman scattering microscope with shot noise limited sensitivity using subharmonically synchronized laser pulses,” *Opt. Express*, vol. 18, no. 13, pp. 13708–13719, 2010.
- [2] Y. Ozeki and K. Itoh, “Stimulated Raman scattering microscopy for live cell imaging with high contrast and high sensitivity,” *Laser Phys.*, vol. 20, no. 5, pp. 1114–1118, 2010.
- [3] M. Yamagiwa, G. Omura, Y. Ozeki, M. Ishii, H. M. Dang, S. Kajiyama, T. Suzuki, K. Fukui, and K. Itoh, “Dual-band stimulated parametric emission microscopy,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 49, p. 016603, 2010.
- [4] T. Kawasumi, Y. Ozeki, and K. Itoh, “Analysis and compensation for artifacts in three-dimensional refractive index profiling by four-wave mixing microscopy,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 49, p. 082701, 2010.
- [5] Y. Ozeki, T. Kawasumi and K. Itoh, “Depth-resolved observation of photoelastic effect by four-wave mixing microscopy,” *Opt. Rev.*, vol. 16, no. 2, pp. 167–169, 2009.
- [6] H. M. Dang, T. Kawasumi, G. Omura, T. Umano, S. Kajiyama, Y. Ozeki, K. Itoh, and K. Fukui, “Three-dimensional unstained live-cell imaging using stimulated parametric emission microscopy,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 48, p. 097003, 2009.
- [7] H. M. Dang, G. Omura, T. Umano, M. Yamagiwa, S. Kajiyama, Y. Ozeki, K. Itoh, and K. Fukui, “Label-free imaging by stimulated parametric emission microscopy reveals a difference in hemoglobin distribution between live and fixed erythrocytes,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 14, p. 040506, 2009.
- [8] Y. Ozeki, F. Dake, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, “Analysis and experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering microscopy,” *Opt. Express*, vol. 17, pp. 3651–3658, 2009.

- [9] M. Yamagiwa, Y. Ozeki, T. Kawasumi, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, “Highly Sensitive Signal Detection in Stimulated Parametric Emission Microscopy Based on Two-Beam Interferometry,” Japanese Journal of Applied Physics, vol. 47, no. 12, pp. 8820–8824 (2008).
- [学会発表] (計 21 件)
- [10] 小関泰之、伊東一良「誘導ラマン散乱によるバイオイメージング」レーザー学会第 31 回年次大会、10aIX4、電気通信大学、2011 年 1 月 10 日。(招待講演)
- [11] Y. Ozeki and K. Itoh, “High-sensitivity stimulated Raman scattering microscopy,” microCARS2010, Bad Honnef, 18th Oct., 2010. (招待講演)
- [12] Y. Ozeki and K. Itoh, “High-sensitivity stimulated Raman scattering (SRS) microscopy based on the subharmonic synchronization technique,” LPHYS’ 10, Seminar 5.6.2, Foz do Iguacu, Brazil, 6th July, 2010. (招待講演)
- [13] Y. Ozeki, Y. Kitagawa, K. Sumimura, N. Nishizawa, W. Umemura, M. Ishii, S. Kajiyama, K. Fukui and K. Itoh, “Subharmonic synchronization of two-color laser pulses for stimulated Raman scattering microscopy,” CLEO2010, CWD1, San Jose, May 2010.
- [14] 小関泰之, 北川雄真, 梅村航, 住村和彦, 西澤典彦, 梶山慎一郎, 福井希一, 伊東一良「高調波同期した 2 波長光源による誘導ラマン散乱顕微鏡の高感度化」第 5 回超高速光エレクトロニクス研究会、慶応大学日吉キャンパス、2010 年 8 月 20 日。(招待講演)
- [15] 小関泰之, 北川雄真, 住村和彦, 西澤典彦, 梅村航, 梶山慎一郎, 福井希一, 伊東一良「ショット雑音限界感度を有する高調波同期型誘導ラマン散乱顕微鏡」2010 年秋季応用物理学会, 16p-D-13, 長崎大学, 2010 年 9 月 16 日。(招待講演)
- [16] 小関泰之、北川雄真、住村和彦、西澤典彦、梅村航、石井万紀子、梶山慎一郎、福井希一、伊東一良、「2 波長パルス光源の高精度な高調波同期による誘導ラマン散乱顕微鏡」2010 年春季応用物理学会、19p-F-11、2010 年 3 月 19 日。
- [17] Y. Ozeki and K. Itoh, “Stimulated Raman scattering microscopy for live-cell imaging with high contrast and high sensitivity,” 18th International Laser Physics Workshop (LPHYS’ 09), paper 5.6.3 (Barcelona, Spain), July 16th (2009) (招待講演)
- [18] Y. Ozeki and K. Itoh, “Stimulated Raman scattering (SRS) microscopy: toward highly sensitive vibrational imaging in the terahertz regime,” 2nd Topical Problems of Biophotonics 2009 (Nizhny Novgorod, Russia), 23rd July (2009) (招待講演)
- [19] S. Kajiyama, Y. Ozeki, K. Fukui, and K. Itoh, “Biological applications of novel nonlinear optical microscopy,” The 2009 Euro American Workshop on Information Optics Paris, France, July 20–24, (2009) (招待講演)
- [20] F. Dake, Y. Ozeki, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, “Experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering microscopy,” the 4th Asian Pacific Symposium on Biophotonics (APBP2009), paper MIC-08, Jeju, Korea, May 29th (2009)
- [21] Y. Ozeki, F. Dake, S. Kajiyama, K. Fukui and K. Itoh, “Background-free, 3-D vibrational imaging by stimulated Raman scattering microscopy,” Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO2009), paper CFL2, Baltimore, USA, June 5th (2009)
- [22] 北川雄真, 小関泰之, 住村和彦, 西澤典彦, 伊東一良, “高調波同期した 2 波長光源による誘導ラマン散乱顕微鏡”, Optics & Photonics Japan2009, 25pB10, 2009 年 11 月 25 日。
- [23] 嶽文宏, 小関泰之, 梶山慎一郎, 福井希一, 伊東一良「誘導ラマン散乱顕微鏡の感度の実験検討」応用物理学会, 31a-ZW-9, 2009 年 3 月 31 日。
- [24] 北川雄真, 嶽文宏, 馬野俊幸, 小関泰之, 梶山慎一郎, 福井希一, 伊東一良「多波長型誘導パラメトリック発光顕微鏡」応用物理学会, 31a-ZW-9, 2009 年 3 月 31 日。
- [25] K. Itoh, “Nonlinear ultra-fast focal-point optics for 3-D microscopy of organic and inorganic substances,” 6th International Conference on Optics Design and Fabrication (ODF2008), paper 9PL-02, Taipei, June 9th, 2008. (招待講演)
- [26] K. Itoh, “Nonlinear Ultra-fast Focal-point Optics (NUFO) for Biology – Nonlinear Microscopy and Manipulation of Intracellular Structures”, LASERLAB Foresight Workshop and Users Meeting, Creta

Maris beach hotel , Heraklion, Crete
Greece, 23-24 October, 2008. (招待
講演)

- [27] T. Kawasumi, Y. Ozeki, and K. Itoh,
“Characterization of
bending-induced density change inside
an optical fiber by use of four-wave
mixing microscopy,” Conference on
Lasers and Electro-Optics (CLEO2008),
paper JWA19, 2008年5月7日.
- [28] Y. Ozeki, T. Kawasumi, and K. Itoh,
“Depth-resolved visualization of
stress-induced anisotropy inside bent
optical fibers by use of four-wave
mixing microscopy,” 6th
International Conference on Optics
Design and Fabrication (ODF2008),
paper 10S2-12, 2008年6月10日.
- [29] 山際将具, 小関泰之, 梶山慎一郎, 福井
希一, 伊東一良「二光束干渉型誘導パラ
メトリック発光顕微法を用いた非線形
位相イメージング」2008年秋季第69
回応用物理学会学術講演会, 2p-ZH-14,
中部大学, 2008年9月2日.
- [30] 嶽文宏, 小関泰之, 伊東一良「誘導ラ
マン散乱顕微法の原理確認」Optics
& Photonics Japan 2008, 5pC12, 2008
年11月5日.

[図書] (計1件)

- [31] S. Kajiyama, Y. Ozeki, K. Fukui and K.
Itoh, “Biological Applications of
Stimulated Parametric Emission
Microscopy and Stimulated Raman
Scattering Microscopy,”
'Information Optics and Photonics,'
Chapter 7, Springer. (2011年出版予定)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

[32] 名称: 「光学顕微鏡」
発明者: 小関泰之, 伊東一良, 嶽文宏, 福井
希一, 梶山慎一郎, 北川悠真, 西澤典彦, 住
村和彦
権利者: 大阪大学
種類: 特願
番号: 2009-2655144
出願年月日: 2009年11月20日
国内外の別: 国内

[33] 名称: 「光学顕微鏡」
発明者: 小関泰之, 伊東一良, 嶽文宏, 福井
希一, 梶山慎一郎
権利者: 大阪大学
種類: 特願

番号: 2009-134364
出願年月日: 2009年6月3日
国内外の別: 国内

[その他]
ホームページ等
www-photonics.mls.eng.osaka-u.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 一良 (ITO KAZUYOSHI)
大阪大学・工学研究科・教授
研究者番号: 80113520

(2) 研究分担者

小関 泰之 (OZEKI YASUYUKI)
大阪大学・工学研究科・助教
研究者番号: 60437374

梶山 慎一郎 (KAJIYAMA SHINICHIRO)
近畿大学・生物理工学部・准教授
研究者番号: 20243496