

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620123

研究課題名(和文) 無発光イメージング法の開発と生命科学への応用

研究課題名(英文) Development of non-fluorescent imaging technique for biological application

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)：本研究では第二高調波発生(SHG)イメージング法に着目し、SHGイメージング専用の無発光分子を開発した。SHGイメージング法自体は、これまでに生体中の構造対称性の低い箇所を観察する方法として知られてきたが、SHGイメージング専用の無発光色素はこれまでに報告例がなかった。我々が開発した色素を細胞に投与すると、明確なSHGシグナルが検出される一方、蛍光は全く検出されなかった。同時に別の蛍光分子を投与した箇所からは蛍光が観測されたことから、SHGと蛍光の独立したシグナルによる同時イメージングが可能であることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Live-cell imaging that combines multiple modalities had grown to be an essential technique in biological studies. In this context, we have focused on second harmonic generation (SHG) imaging technique, and have developed novel dyes that generate SHG signal but no fluorescence signal. SHG imaging technique has been shown to be useful in analyzing biological phenomena, the all dyes used so far for SHG imaging emit fluorescence and therefore multimodal imaging of these had been difficult. When the cell was stained directly with one of the dye, only SHG signals were detected without any fluorescence signal, indicating that these SHG-specific dyes do not interfere with fluorescence images of other fluorescent dyes. Therefore, with this new SHG specific dye, SHG and fluorescence imaging can be performed simultaneously without interference, enabling true multimodal imaging of biological phenomena for the first time.

研究分野：有機光化学

キーワード：SHGイメージング SHG顕微鏡 第二高調波発生 バイオイメージング アゾベンゼン 膜染色 無発光性色素

## 1. 研究開始当初の背景

生命科学の研究において、生命現象の可視化がその進展の鍵となる。多様な可視化技術の中で蛍光顕微鏡は、その低侵襲性や感度の良さなどから今や生命科学研究を牽引する最も有効な手法としてその地位を確立するに至った。蛍光顕微鏡の中でも、2光子励起蛍光顕微鏡は、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。

この状況の中で、同じ2光子顕微鏡技術でありながら、分子の励起とそれに伴う蛍光を利用しない技術にも注目が集まっている。SHG顕微鏡である。SHG顕微鏡のシグナルとなる第二高調波発生 (Second Harmonic Generation: SHG) は、二つの光子がある狭い空間の中で高密度で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ある。この現象は古くからレーザー等の基盤技術として利用されてきた。SHGが起こるためには、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。例えば生体内ではコラーゲン繊維などがこの発生条件を満たす事でSHG現象を特異的に起こす。以前よりこのような特別な構造体におけるSHGイメージングは報告されてきた。

SHGイメージングには蛍光イメージングには無い大きなメリットがある。蛍光イメージングの最大の弱点は、色素が光のエネルギーを吸収してそれを蛍光として放出する。すなわち、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。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、より良い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

る。それに対し、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、観測対象に悪影響も与える事無く観測する事が可能となり、生体现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。

## 2. 研究の目的

SHGイメージング法は、このような特徴から今後の生命科学・医療分野への応用が期待されているが、実際に様々な場面でSHGシグナルを得るためには、合成された色素の投与が必要不可欠となってくる。実際、これまでも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。すなわち、SHGシグナルと同時に蛍光シグナルも観測されている。これではSHGイメージングの強みが生かされておらず、イメージング技術そのものにブレークスルーをもたらすには至らない。そこで本研究では、蛍光放出を一切しないSHG専用の色素を開発することとした。これにより、SHGイメージングと同時に全く別の箇所に投与した蛍光シグナルと観測することが出来る。その際、得られる蛍光シグナルは、SHG専用色素からのシグナルからは完全に独立したことになる。すなわち1つの細胞から発生原理の異なる複数種のシグナルを同時に観測できることになる。

## 3. 研究の方法

上記の無蛍光性のSHGイメージング専用の色素の開発を目指し研究が行われた。まず、光を吸収しても蛍光を全く放射しない構造にするため、置換基を少しずつ変えた一連のアゾベンゼン系色素を設計し合成した。その際、細胞膜に効率よく取り込まれると同時に、細胞外液の洗浄で周囲の分子を洗い流せるように適度な水溶性を持たせることとした。合

成後、各種測定による分子の構造決定および色素分子の光物性を調べるとともに、SHG イメージングを専門とする研究者との共同作業により、化合物のテストが行われた。

#### 4. 研究成果

本研究では目的達成のため、様々な類縁体を合成し、それぞれに対してテストを行った。まず当初に目的とした分子の合成は成功し各種測定による分子構造決定も行うことができた。合成した一連の色素分子はいずれも各種有機溶媒中、水溶液中、および細胞膜を模した界面活性剤ミセル中で、予想通り蛍光は観測されなかった。細胞毒性は分子の構造により、顕著なものから殆ど無いものまで様々であった。次に細胞毒性の低い分子を用いて培養細胞を染色し、2光子顕微鏡で観察した所、この場合も顕著なSHGシグナルのみ観測され、蛍光は全く観測されなかった。これは無蛍光性のSHGイメージング専用色素として開発された初めての例である。これにより、当初の目的がほぼ達成され、本研究技術で特許を取得した。今後の展望として、2光子顕微鏡におけるSHGイメージングと2光子蛍光イメージングの同時観察法を確立し、引き続き当該分野発展への貢献を目指す。

#### 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 1 件)

- ① Nuriya, M.; Momotake, A.; Kimura, Y.; Yasui, M.; Kasai, H.; Arai, T. Evaluation of Dialkylaminofluorene- Based Hemicyanine Dyes for Second Harmonic Generation Imaging by the Direct Comparison Approach, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2013**, 86,10,1190-92, DOI:10.1246/bcsj.20130094 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ①森田里穂・百武篤也・新井達郎：光誘起電子移動型ケージド化合物の光分解反応効率に対する溶媒および犠牲還元剤の効果 日本化学会第95春季年会 2015, 3, 26-29 日本大学船橋キャンパス (千葉県船橋市) 1PA-046
- ②森田里穂・百武篤也・新井達郎：光誘起電子移動型ケージド化合物の光分解反応効率に対する電子ドナーの効果 2014年光化学討論会, 2014. 10. 11-13, 北海道大学 (北海道札幌市) 2P033
- ③森田里穂・百武篤也・新井達郎：光誘起電子移動型ケージド化合物の光分解反応と高機能化 日本化学会第94春季年会(2014) 2014, 3, 27-30 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市) 1A1- 34
- ④本田拓也・百武篤也・新井達郎：光誘起生理活性物質放出を目指した機能性ケージド化合物の合成とその光化学 2013年光化学討論会 2013, 9, 11-13 愛媛大学 (愛媛県松山市) 3P067

[産業財産権]

取得状況 (計 1 件)

名称 : Compounds for second harmonic generation, dye composition containing it for second harmonic generation, and cell examination method using it

発明者 : Nuriya, Mutsuo; Yasui, Masato; Arai, Tatsuo; Momotake, Atsuya; Fukushima, Syun

権利者 : Keio

University, Japan; University of Tsukuba

種類 : PCT Int. Appl.

番号 : WO 2014189145

出願年月日 : 2014/5/27

取得年月日 : 2014/11/27

国内外の別 : 国内

## 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