

2016年5月9日  
慶應義塾大学医学部  
国立大学法人筑波大学

## 蛍光性色素に代わる 光らない観測物質

### SHG 専用色素の開発と応用に 世界に先駆けて成功

このたび、慶應義塾大学医学部薬理学教室 安井正人教授、塗谷（ぬりや）睦生専任講師、篠塚崇徳（当時、大学院生）のグループと、筑波大学数理物質系（学際物質科学研究センター）新井達郎教授、百武篤也講師、福嶋瞬（当時、大学院生）のグループとの共同研究により、世界に先駆けて、脳細胞などの形や細胞膜の現象を観測するのに有効な「光第二高調波発生（Second Harmonic Generation : SHG）専用色素」（注1）の開発と応用に成功しました。

細胞表面を覆う細胞膜の形や機能は、細胞機能を司る最も重要な要素です。従って細胞膜現象を可視化・計測することは、細胞の正常な働きとその破綻の理解の鍵を握ります。これまでその研究の多くは観測物質に蛍光性タンパク質や蛍光性色素を利用することにより進められてきましたが、蛍光シグナルが強くなることにより他の蛍光色素の観測を阻害するなど、さまざまな観測上の限界がありました。一方、緑色レーザーポインターなどにも使われる SHG と呼ばれる光学現象を利用した観測は、細胞膜現象の可視化などに非常に有用であることが示唆されながら、観測に適した色素が無かったためライフサイエンスで使われることは稀でした。

今回の成果によって、これまで観測が難しかった細胞膜現象を定量的に理解する手法が確立します。この新たなツールによって細胞生物学研究の発展が大きく加速することが期待されます。

本研究成果は、2016年5月9日（英国時間）に英国科学誌 Nature Communications のオンライン速報版で公開されます。

#### 1. 研究の背景と概要

SHG 顕微鏡は分子群の構造を可視化することができる特殊な 2 光子顕微鏡技術（注2）を用いており、この特性を利用した研究は、コラーゲンの構造変化を伴う癌組織の無染色組織診断など、医学分野へも展開されています。また、これまで計測できなかった部位における神経細胞の膜電位の計測や分子構造変化の計測などが報告されており、ライフサイエンスの研究への更なる応用が期待されています。しかし蛍光色素や蛍光タンパク質の精力的な開発により飛躍的な進化を遂げた 2 光子蛍光顕微鏡とは対照的に、適した色素が無いことから、色素を用いた SHG 顕微鏡のライフサイエンスへの応用は非常に限られてきました。これまで SHG 顕微鏡に用いられてきた色素は蛍光観測用に開発されたもので、SHG とは無関係の蛍光シグナルが強くなることにより他の蛍光色素の観測を阻害する他、光吸収に伴う色素の分解や構造変化によるシグナル低下（光褪色）や細胞毒性など、多くの問題がありました。

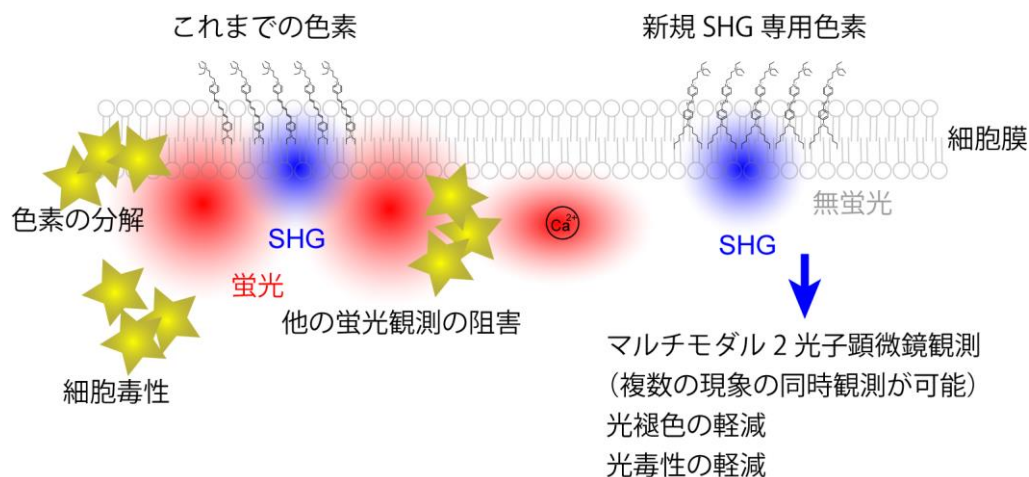
そのような現状から、SHG のみに特化した色素とそれを利用した SHG 顕微鏡技術の発展が長く望まれてきました。

## 2. 研究の成果と意義・今後の展開

今回の研究では、無蛍光 SHG 性を持つ色素の開発と応用を試みました。このため、光を吸収しても無輻射失活（注3）により速やかに元の状態に戻ることが知られているアゾベンゼン化合物に着目し、これまで SHG 顕微鏡に用いられてきた FM4-64 色素の構造を改変することで、Ap3 という色素を合成しました。

Ap3 を培養液に加えることで培養細胞を染色し近赤外レーザーを照射したところ、SHG シグナルと共に非常に強い蛍光を発する FM4-64 とは対照的に、Ap3 は SHG シグナルを発するものの蛍光は全く発さないことが示され、Ap3 が無蛍光 SHG 性を有する初めての色素であることが明らかとなりました。更に、マウスの脳組織内の神経細胞に色素を導入して顕微鏡観測したところ、Ap3 が無蛍光 SHG 性を有するのみならず、光照射に対して非常に安定であること、そして光照射に応じた細胞毒性が FM4-64 に比べて軽減されていることが明らかとなり、これまで知られていなかった SHG 専用色素の優れた特性が明らかとなりました。また、Ap3 による SHG シグナルは膜電位の変化に応答することが分かり、膜電位の計測にも応用可能であることがわかりました。

更に、培養細胞や神経細胞において細胞内の構造や細胞内カルシウム濃度を可視化する、これまでに開発されてきた市販の蛍光色素と SHG 色素を同時に導入し、異なる光学現象に基づいた複数の生命現象の同時観測を試みました。FM4-64 では、強い蛍光のために他の蛍光色素との同時可視化ができなかったのに対し、無蛍光性の Ap3 は他の蛍光色素からの情報を妨げること無く SHG により膜の現象を可視化することができることが明らかになりました。



これらの結果から、Ap3 を用いた SHG 顕微鏡観測により、細胞膜とその付近で起こるカルシウム情報伝達などの複雑な生命現象の解明のための研究が大きく進展することが期待されます。また、世界初となる無蛍光 SHG 色素が多く優れた特性を持つことから、これまで蛍光性の改善に目が向けられてきた色素開発の分野に新たな領域が期待できます。

## 3. 特記事項

MEXT/JSPS 科研費 23350075,23657106,25620123,26117516,26650052,15K13735、興和生

命科学財団研究補助金、サントリー生命科学財団 SUNBOR GRANT および彩加基金の支援によって行われました。

#### 4. 論文

Multimodal two-photon imaging using a second harmonic generation-specific dye

光第二高調波発生専用色素を用いたマルチモダル 2 光子イメージング

Mutsuo Nuriya <sup>\*,#</sup>, Shun Fukushima <sup>\*</sup>, Atsuya Momotake, Takanori Shinotsuka, Masato Yasui & Tatsuo Arai <sup>#</sup>.(\*; equal first authors and #; equal corresponding authors)

塗谷睦生 <sup>\*,#</sup>、福嶋瞬 <sup>\*</sup>、百武篤也、篠塚崇徳、安井正人、新井達郎 <sup>#</sup>

##### 【用語解説】

(注1) 光第二高調波発生 (SHG)

光第二高調波発生 (Second Harmonic Generation、略して SHG) は同じ波長を持った二つの光子がその半分の波長を持つ一つの光子へと変換される現象です。緑色のレーザーポインターにおいて近赤外の光を緑色の光に変換するのもに使われている身近な光学現象です。

(注2) 2 光子顕微鏡

色素などの分子と光の相互作用の内、分子一つと光子二つの反応を二光子反応と呼び、これを利用した顕微鏡を 2 光子顕微鏡と呼びます。2 光子顕微鏡では通常用いられる可視光より波長が長く脳を含めた組織への透過性に優れた近赤外光が用いられ、また 2 光子現象が焦点部位に局限して起こるため、2 光子顕微鏡では組織深部における非侵襲的な観測が可能となります。

(注3) 無輻射失活

光の吸収などにより励起された電子が光以外の形でエネルギーを放出して低いエネルギー状態に移ることを表します。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、筑波研究学園都市記者会、各社科学部等に配信しております。

---

##### 【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部 薬理学教室 専任講師  
塗谷睦生 (ぬりやむつお)

国立大学法人筑波大学数理物質系 (学際物質科学研究センター) 教授 新井達郎 (あらいたつお)

##### 【報道担当】

慶應義塾大学  
信濃町キャンパス総務課:谷口・吉岡  
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35  
TEL 03-5363-3611 FAX 03-5363-3612  
E-mail::med-koho@adst.keio.ac.jp  
<http://www.med.keio.ac.jp/>  
※ 本リリースのカラー版をご希望の方は  
上記までご連絡ください。

国立大学法人筑波大学広報室  
〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1  
Tel : 029-853-2039 Fax : 029-853-2014  
E-mail:kohositu@un.tsukuba.ac.jp