

課題番号	LR024
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	生体機能可視化のための超解像分子イメージング技術の開発
研究機関・ 部局・職名	大阪大学・大学院工学研究科・准教授
氏名	藤田克昌

1. 当該年度の研究目的

<p>1) 多光子飽和励起応答の計測とそれを利用した超解像観察 多光子励起の飽和により高次の非線形応答を示す蛍光分子を選択し、その高次非線形応答を確認する。標準試料の観察を通して空間分解能の向上を確認する。</p> <p>2) 非線形応答分子の開発 複数の光子が入射した際にはじめて発光する、非線形応答蛍光プローブの開発を行う。開発した蛍光分子の励起-発光特性を測定し、その蛍光応答を確認する。</p> <p>3) 超高速分光測定装置による非線形応答分子の分析 超高速分光測定装置を用いて、非線形応答分子の励起状態の変化を測定し、想定されているメカニズムで非線形な蛍光応答が示されているかどうかを確認する。</p> <p>4) 蛍光タンパク質の多光子励起 蛍光タンパク質の多光子励起に適した波長を実験的に確認する。励起光強度に対する蛍光強度の関係を測定し、多光子励起による発光が得られているかどうかを確認する。</p>

2. 研究の実施状況

<p>1) 多光子飽和励起応答の計測とそれを利用した超解像観察 ローダミン6Gの多光子励起において顕著な飽和現象が見られた。昨年度に開発した飽和励起顕微鏡を用いて蛍光信号の高調波復調計測を行い、飽和により4次の非線形応答が得られることを確認した。また、蛍光ビースを試料として多光子飽和励起観察を行った結果、面内方向、光軸方向ともに空間分解能の向上を確認した。</p> <p>2) 非線形応答分子の開発 光蛍光分子BODIPYをドナーとして用いた非線形応答蛍光分子を開発した。波長488nmのレーザー光で励起した結果、励起光強度-蛍光強度との関係に2次の非線形性を確認した。</p> <p>3) 超高速分光測定装置による非線形応答分子の分析 上記で開発した蛍光分子のエネルギー状態の変化を過渡吸収分光を行い、各励起状態の滞在時間を測定した。その測定結果を計算パラメーターに導入したエネルギー準位モデルを用いて蛍光応答をシミュレートした結果、実験結果と同様の非線形応答を得ることに成功した。</p>

4) 蛍光タンパク質の多光子励起

Sirius、CFP、TFP、GFPにおいて効率的に多光子励起が可能な波長を得た。それぞれの波長において、励起光強度と蛍光強度との関係をもとめ、多光子励起による発光が得られていることを確認した。また、それらを用いた高解像度イメージングにも成功した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文</p> <p>計 8 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. M. Yamanaka, Y.-K. Tzeng, S. Kawano, N. I. Smith, S. Kawata, H.-C. Chang, and <u>K. Fujita</u>, "SAX microscopy with fluorescent nanodiamond probes for high-resolution fluorescence imaging," Biomed. Opt. Express, Vol. 2, Issue 7, pp. 1946-1954 (2011). 2. M. Honda, Y. Saito, N. I. Smith, <u>K. Fujita</u>, and S. Kawata, "Nanoscale heating of laser irradiated single gold nanoparticles in liquid," Opt. Express, Vol. 19, Issue 13, pp. 12375-12383 (2011). 3. M.-L. Zheng, <u>K. Fujita</u>, W.-Q. Chen, X.-M. Duan, S. Kawata, "Two-Photon Excited Fluorescence and Second-Harmonic Generation of the DAST Organic Nanocrystals," J. Phys. Chem. C, Vol.115, No.18, pp. 8988-8993 (2011). 4. S. Kawano, N. I. Smith, M. Yamanaka, S. Kawata and <u>K. Fujita</u>, "Determination of the expanded optical transfer function in saturated excitation imaging and high harmonic demodulation," Appl. Phys. Express, Vol.4, 042401 (2011). <p>(掲載済み一査読無し) 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>藤田克昌</u>, 齋藤結花, "超解像イメージング," ぶんせき, No.3, pp.142-149 (2012). 2. <u>藤田克昌</u>, "化学とバイオイメージング," 化学と生物, Vol.49, pp.852-856 (2011).. 3. <u>藤田克昌</u>, "ラマン顕微鏡"の開発," 分光研究 Vol.60, No.5, pp.185-186 (2011). 4. 山中真仁, <u>藤田克昌</u>, "飽和励起を利用した高空間分解蛍光イメージング(SAX 顕微鏡)," OPTORONICS, Vol. 30, No.335 (2011). <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表</p> <p>計 10 件</p>	<p>専門家向け 計 9 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>K. Fujita</u>, "Resolution improvement in laser scanning microscopy by using saturated and nonlinear excitation," 第 59 回応用物理学関係連合講演会 シンポジウム:最先端バイオイメージング(早稲田大学, 2012 年 3 月 15 日). 2. <u>藤田克昌</u>, "回折限界を超えた光学顕微鏡:原理と将来展望," 電顕技術開発若手研究会 第 3 回ワークショップ「様々なイメージング技術の現況と展望」(名古屋, 2012 年 1 月 5~6 日). 3. <u>K. Fujita</u>, "High resolution confocal microscopy by using saturated excitaiton of fluorescence," Japan-Korea Biomedical Optics Symposium, Optics & Photonics Japan 2011 (OPJ2011) (大阪, 29 Nov 2011) 4. Mei-Ling Zheng, <u>Katsumasa Fujita</u>, Wei-Qiang Chen, Xuan-Ming Duan, Satoshi Kawata, "Two-Photon Excited Fluorescence and Second-Harmonic Generation of the DAST Organic Nanocrystals," International Conference on Nanoscience & Technology(ChinaNANO2011), (Beijin, 7-9 September 2011). 5. <u>K. Fujita</u>, "High-resolution confocal microscopy using optical saturation and nonlinear excitation," 第 20 回バイオイメージング学会 国際シンポジウム (千歳, 2011 年 9 月 1~2 日). 6. 山中真仁, <u>藤田克昌</u>, "光学応答の飽和を用いた超解像," 第 37 回レーザー顕微鏡研究会 シンポジウム「光の回折限界を超えた顕微鏡とその応用」(和光市, 2011 年 7 月 6 日). 7. <u>K. Fujita</u>, "Raman microscopy for visualization of cellular functions," RIKEN CDB-QBiC Joint Symposium (Kobe, 30 June - 1 July 2011).

様式19 別紙1

	<p>8. M. Yamanaka, S. Kawano, N.I. Smith, S. Kawata, <u>K. Fujita</u>, "Saturated excitation (SAX) microscopy; depth resolution," Focus on Microscopy 2011 (Konstantz, 18 April 2011).</p> <p>9. M.-L. Zheng, <u>K. Fujita</u>, W.-Q. Chen, X.-M. Duan, S. Kawata, "Selective staining for subcellular structures by carbazole-Based cyanine probes in nonlinear optical microscopy," Focus on Microscopy 2011 (Konstantz, 19 April 2011).</p> <p>一般向け 計 1 件</p> <p>1. <u>藤田克昌</u>, "顕微光学," 大阪大学ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究推進機構 社会人再教育プログラム(2011年6月22日, 阪大中之島センター)</p>
<p>図書</p> <p>計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況</p> <p>計 2 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 2 件</p> <p>1. 名称 Nonlinear luminescent molecule, fluorescent stain, and observation method (米国) 発明者 <u>藤田克昌</u>、水上進、菊地和也、河田聡、河野省悟、出願人 大阪大学 出願番号 13/380,749、移行日 2012年1月19日、権利者 大阪大学</p> <p>2. 名称: Nonlinear luminescent molecule, fluorescent stain, and observation method (欧州) 発明者 <u>藤田克昌</u>、水上進、菊地和也、河田聡、河野省悟、出願人 大阪大学 出願番号: 10791832.8、移行日 2011年12月23日、権利者 大阪大学</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>大阪大 大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 <u>藤田克昌</u></p> <p>http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/ap1g1kat/index_j.html</p> <p>大阪大学・最先端・次世代研究開発支援プログラム</p> <p>http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next</p> <p>大阪大学大型教育研究プロジェクト支援室・最先端・次世代研究開発支援プログラム</p> <p>http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>2011年8月10日に大阪大学「オープンキャンパス」にて6名の高校生を対象とした研究体験会を開催した。 1)細胞の培養、2)細胞の染色、3)レーザー走査顕微鏡を利用した3次元顕微観察、3つの内容についてレクチャーし、各内容について実験をしていただいた。</p> <p>2011年10月23日に大阪大学フォトニクスセンターと共同で、地域の50名の小学生を対象とした光科学体験セミナー「スーパー光塾」を大阪大学銀杏会館にて開催した。ペットボトルとガラス玉を用いた簡単な顕微鏡の作成とそれによる身近な微小物体の観察を体験していただいた。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計 0 件</p>	
<p>その他</p>	<p>2011年8月29～9月1日に山形大学において開催された応用物理学会第72回応用物理学会学術講演会展示会において、特別展示「ラマン分光イメージング:革新と波及」を企画、実施し、新しい光学顕微鏡技術の一般への紹介を行った。</p>

4. その他特記事項

2011年12月1日 日本分光学会賞(奨励賞)を受賞。

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	123,000,000	46,591,000	0	76,409,000	0
間接経費	36,900,000	13,977,300	0	22,922,700	0
合計	159,900,000	60,568,300	0	99,331,700	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	46,191,000	0	0	46,191,000	46,157,243	33,757	0
間接経費	13,977,300	0	0	13,977,300	7,504,738	6,472,562	0
合計	60,168,300	0	0	60,168,300	53,661,981	6,506,319	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	32,190,083	マイクロレンズアレイスキャナ他やフィルター等消耗品
旅費	1,016,347	学会やシンポジウム等へ参加
謝金・人件費等	12,368,380	特任研究員3名(内非常勤1名)、特任事務職員1名
その他	582,433	実験具の修理や学会参加費等
直接経費計	46,157,243	
間接経費計	7,504,738	
合計	53,661,981	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
マイクロレンズアレイ スキャナ(共焦点スキャナ ユニット)	CSU-X1-A-PTSP2	1	8,620,500	8,620,500	2012/1/26	大阪大学
倒立型オートフォーカ ス顕微鏡システム	X81ZDC2(フォーカス制 御、外部位相差ユニット、 右サイドポートユニット、冷 却CCD、制御ソフトウェア 込み)	1	7,990,500	7,990,500	2012/1/30	大阪大学
電子冷却型 EMCCD	ProEM:1024B- eXcelon	1	5,722,500	5,722,500	2011/10/27	大阪大学
ガルバノスキャナ	VM500PLUS 6mmDS XY	2	556,500	1,113,000	2011/10/28	大阪大学
池田理化製超安定 性ステージ	KS-0	1	926,100	926,100	2012/2/27	大阪大学

IX81ZDC2用培養装置チャンバーのみ	INU-SFB	1	897,750	897,750	2011/11/25	大阪大学
8チャンネル電流/電圧増幅装置	AS-905-1、SMB-BNC、AEL31580P	1	858,900	858,900	2012/3/26	大阪大学
三洋電機製CO2インキュベーター	MCO-5AC(UV)	1	604,800	604,800	2011/6/22	大阪大学