

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域
「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」
研究課題
「高性能レーザーによる細胞光イメージング・
光制御と光損傷機構の解明」

研究終了報告書

研究期間 平成22年10月～平成28年3月

研究代表者：小林 孝嘉
(電気通信大学 先端超高速レーザー研究
センター、特任教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究課題の目標は、「細胞群構造・細胞構造・細胞内構造を高い空間分解能で観察出来る新たな顕微イメージング法の開発と、それを用いた複雑な生命現象の解明」である。具体的には、研究チームの中心となる小林 G(グループ)は顕微鏡下で生理過程を観察する新奇な高性能イメージング法を開発する。実際の対象として、河西 G と協力して、マウス脳標本試料のシナプス機能等の生理過程の解明するためにイメージングを行う。安倍 G は光制御用分子 (2 光子励起用ケージド分子) を開発し、それを河西 G が大脳シナプス機能解明に応用する。小林 G はそれらの分子の 2 光子吸収断面積・光解離効率を測定し、ケージド分子の特性評価を行い、最適な分子設計の指針を得て安倍 G の合成を支える。本研究課題で得られた成果を以下に示す。

小林 G の研究テーマは「**新奇高性能顕微法の開発**」と「**光劣化初期過程機構の解明**」である。

「**新奇高性能顕微法の開発**」では同時多色顕微イメージング法の開発を推進した。この顕微イメージング法の 3 構成要素は新光源・新検出器・新測定原理である。新光源としてカスケードパラメトリック四光波光源とチェレンコフ光源を開発した。またレーザー雑音の影響を抑えるため、新機構ノイズキャンセル検出器を開発し、高感度低雑音検出が可能となった。新測定原理はポンプ-プローブ分光測定法に基づいており、同時多色多モード超解像顕微イメージングできることが特徴である。ポンプ-プローブ測定法の信号強度は、ポンプ光とプローブ光の (i) 空間的強度、(ii) 時間的強度の積に比例する。(i)、(ii) により、それぞれ (i) 「超解像」(ii) 「クロストークの除去」が可能になる。この原理をフルに活かした 4 つのイメージング法 (①誘導放出誘起蛍光消光 (SEIFIR) イメージング、②誘導放出誘起プローブ光増幅 (SEIG) イメージング、③光熱 (PT) イメージング、④誘導放出誘起光増幅減衰時間 (SLIM) イメージング法) を開発した。これらのイメージング法を組み合わせた同時多 (①-④) モードイメージングも可能である (これらについては、論文発表・特許出願済み [論文・特許リストの中の*])。

特に顕著な業績は、光熱イメージングと蛍光イメージングとを組み合わせた 2 モードイメージングで、マウス脳のニューロン (神経細胞) 網とグリア細胞 (神経膠細胞) 網の 3 次元超解像同時イメージングに世界で初めて成功したことである [論文投稿準備中]。このときに得られたイメージは、シナプスの収縮・除去の瞬間の観察像であると考えられる構造が見られた。このマウス脳イメージングに関連して、河西 G は光刺激による抑制性伝達物質 (GABA) の放出によって引き起こされる、シナプスの収縮・除去の機構を明らかにし記憶消去に成功した [T14,15]。更に小林 G は多色イメージングにより 3 種のグリア細胞を分離イメージしニューロンへの伝達物質付与に関わるアストログリア、損傷ニューロンを貪食 (記憶消去後シナプス除去) するミクログリア、ニューロン内伝達速度を高速化するオリゴデンドロサイト、及び血管網の同時イメージが可能になる。

このような医理工連携の共同研究により、記憶・忘却の機構に関わるシナプスの増大・収縮・除去に関連して、収縮・除去を担うミクログリア細胞の同時イメージングが可能になった。それにより、ニューロンとグリア細胞の GABA を介した包括的な描像が得られ、GABA の睡眠、言語学習の臨界期、自閉症発生への役割が明らかになることが期待される。

これまでグリア細胞は脳にニューロンよりも多く存在する重要な構成要素であるにもかかわらず、ニューロンに比べて研究が進んで来なかったが、最近非常に多くの研究が活発になされるようになり、新しい研究手法が求められている。本研究の成果である グリア細胞網とニューロン網、更に血管網の同時超解像イメージングは、これからの脳神経系研究の一つの手法として大きく広がる可能性がある。

このように、小林 G の開発した顕微イメージング法を用いて、河西 G の研究対象であるニューロン・グリア細胞・血管、さらに小林 G メンバー鶴井の研究対象である免疫細胞や心筋細胞、腎細胞の「**超解像ショット雑音限界イメージング**」に成功した。河西 G は 2 色アンケーシング法を開発し、大脳シナプスの競合機構について初めて明らかにし、小林 G の開発する多色レーザーの新応用領域を拓いた。安倍 G は小林 G の新 2 光子吸収測定法に依る測定結果を取り入れてケージドカルシウム試薬分子の設計を行い、新規分子を発明した [論文 H22]。それを用いて、河西 G は大脳シナプス前部の超高速開口放出機構解明の研究を行った。

「光劣化初期過程機構の解明」のテーマとして、安倍Gの新しく開発した2光子吸収によりアンケーシングする分子の、光アンケーシングの機構である光解離機構の研究を進めた。さらに、顕微イメージングの障害となる光劣化の機構を解明した。安倍Gの合成した分子を、河西Gが2光子アンケーシングに用いた。もう一つの大きな課題として、小林Gはこれまで測定出来なかった核酸塩基の「超短寿命励起状態の直接測定」に初めて成功した。これにより、核酸塩基の紫外励起下における光劣化回避機構をDUV波長域における世界最高の10fs分解能で初めて明らかにした。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. フォトサーマル(PT)顕微イメージング法による脳組織のニューロン網・グリア細胞網・血管網を同時可視化～脳内ネットワーク機構の解明へ

概要: 半導体レーザー及びファイバーレーザーを光源とした高解像・高感度PT顕微イメージング法により、様々な生体組織の多波長・三次元イメージングを行った。特に、脳組織のニューロン網とグリア細胞網とを同時可視化し、損傷を受けたシナプスを貪食している状態にあると思われるマイクログリア細胞のイメージングや、血液脳関門のニューロン・グリア細胞の三次元相互位置関係を示すイメージングに成功した。これら生体試料の三次元像は通常の光学顕微鏡では鮮明に見られた例がなく、また、電子顕微鏡を用いた場合には生きてたままで見ることが出来ない。このような困難な系を対象の同時可視化に初めて成功した。[D49(被引用件数8),D50(被引用件数7),Dd8]

2. 2光子励起に優れた発色団の設計、合成、および光反応性～高効率アンケーシングへ

概要: 本研究では、スチルベンが比較的小さな π 電子系化合物でありながら、512 nmに12 GMの2光子断面積を持つことに着目し、河西Gで実施される生理学実験に優れた近赤外領域に2光子励起反応性を持つ発色団の開発を実施した。励起状態から結合開裂を誘発するため、環状骨格スチルベン誘導体を設計し、合成し、その光反応性を確認した。小林Gによる2光子吸収スペクトルの測定により、近赤外領域(>700 nm)に大きな2光子断面積(~120 GM)を持つ分子の開発に成功した。本研究は、2014年にアメリカ化学会誌、The Journal of Organic ChemistryのFeatured Articleに選出された。[H22(被引用件数8),Hd1=Dd4]

3. ドーパミンの脳内報酬作用機構を解明～依存症など精神疾患の理解・治療へ

概要: 快楽中枢である側坐核の神経細胞において、グルタミン酸とドーパミン刺激を独立に制御し、シナプスの結合強度の変化に対するドーパミンの作用をマウスにおいて解明した。ドーパミンの報酬作用は、スパインが活性化された直後2秒以内の狭い時間枠でのみ、シナプスの結合を強化することが明らかとなった。報酬作用の神経基盤を明らかにした本成果は、依存症や強迫性障害などの精神疾患の理解・治療に新しい展望をもたらすと期待される。[T13(被引用件数17)]

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 半導体レーザーによるショット雑音限界超解像誘導放出顕微鏡～パーソナル超解像顕微鏡へ

概要: 誘導放出を利用するためには通常、光源として超短パルスレーザー、また高感度測定のための特別な検出系が必要であり、コスト、スペース、維持管理の困難さ等のため、誘導放出を用いた顕微鏡の研究例はほとんどない。本研究では超短パルスレーザーに比べて2桁近く安価でかつコンパクトで取扱い容易な半導体レーザーを光源として、ショット雑音限界の高感度な超解像顕微鏡を開発した。今後、企業化開発が進めば、医学・生物学研究や材料研究などの現場(医療現場、フィールドワーク、さらには過疎地や発展途上国)への広汎な波及効果が期待される。[D46(被引用件数12),Dd1-3,Dd5-8,Df1-3]

2. リアルタイム非染色イメージング～非侵襲生体ライブイメージングへ

概要: 通常のレーザー顕微鏡では、無蛍光性試料を非染色で観察することはできず、蛍光染色が必要となる。本研究では、無蛍光性試料の非染色観察可能なイメージング法を開発した。光励起した分子近傍では通常、温度上昇により微弱な屈折率変化($\sim 10^{-4}$)が引き起こされる(フォトサー

マル(PT)効果)。PT効果を利用することで無蛍光性分子を高感度(1分子検出可能 [Science, 330, 353 (2010)])検出することができる。これにより、半導体レーザーを光源とした高解像・高感度なポンプ・プローブ PT顕微鏡を開発した。[D49(引用回数 8),D50(引用回数7),Dd8]

*上記の1. 2. は同一の顕微鏡でイメージング可能

3. 分光分析のためのノイズキャンセリング法の開発～瞬時分析イメージングへ

概要:フォトニック結晶ファイバー(PCF)による白色光の大きな強度雑音は、高速多色イメージングへの応用上の障害となっている。そこで、単一の光検出素子を用いた上で、プローブ光と参照光の強度比の不均衡を補正する機能を有する、多色イメージングなどの分光分析に適したバランス検出器を開発した。本方法により、PCFの取り扱い容易性・低コスト性を保持しつつ、雑音の問題が解決され、様々な分野への高速多色イメージングの道が切り開かれる。[D36(被引用件数 4), D44(被引用件数 2),Dd1-3,5-7,Df1-3)

§ 2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

①「電気通信大学」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
小林 孝嘉	電気通信大学	特任教授	H22. 10～
藪下 篤史	国立交通大學	准教授	H25. 10～
貴田 祐一郎	電気通信大学	特任助教	H22. 10～ H23.8
劉 軍 (LiuJun)	電気通信大学	特任助教	H22. 10～ H23.8
杜 鵬 (DuJuan)	Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics	教授	H22. 10～
姜 永亮 (JiangYongliang)	電気通信大学	特任助教	H23. 4～ H24.10
宮崎 淳	電気通信大学	特任助教	H23. 4～
瀬戸 啓介	東京理科大学	助教	H23. 4～
薛 冰(Xue Bing)	電気通信大学	産学官連携研究員	H23. 6～
何 晋平 (He Jinping)	電気通信大学	特任助教	H23. 7～
王楠 (Nan Wang)	電気通信大学	産学官連携研究員	H24. 10～
富松 透	電気通信大学	産学官連携研究員	H27. 3～
鶴井 博理	順天堂大学医学部 病理・腫瘍学講座	助教	H22. 10～
徳永 英司	東京理科大学理学部物理学科	准教授	H22. 10～
中田和明	電気通信大学	産学官連携研究員	H23. 4～
Arkadiusz Jarota	電気通信大学	JSPS 外国人特別研究員	H24.12～ H26.11

後藤 美苗	電気通信大学	研究補助員	H23.4～ H24.3
北川 則子	電気通信大学	研究補助員	H24.4～

研究項目

- ・ 同時多色誘導放出イメージング
- ・ 超解像蛍光顕微イメージング
- ・ 光熱超解像顕微イメージング
- ・ 誘導ラマン散乱イメージング
- ・ 光解離・光劣化初期過程機構の研究

②「広島大学」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
安倍 学	広島大学理学研究科	教授	H22.10～H28.3
平賀 良和	同上	助教	H22.10～H.23.5
高木 隆吉	同上	助教	H22.10～H.23.5
伊藤 晋平	同上	CREST研究員	H23.4～H24.3
Srikanth Boinapally	同上	CREST研究員	H24.4～H25.3
Fanny Vazard	同上	CREST研究員	H24.4～H25.3
Satish Jakkampudi	同上	CREST研究員	H26.10～H28.3

研究項目

- ・ 光解離性分子の合成
- ・ 光解離性分子の物性評価
- ・ 光解離性分子の光反応

③「東京大学」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
河西 春郎	東京大学医学系研究科	教授	H22.10～
渡邊 恵	同上	特任助教	H25.4～H26.3
長岡 陽	同上	特任研究員	H26.4～H28.3

研究項目

- ・ 新規ケージド分子実験
- ・ ケージド分子と光遺伝学の組み合わせ
- ・ シナプス光遺伝学の創生
- ・ 小林Gによる新奇医学応用顕微鏡の支援

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 サブテーマ名1 光イメージング・光制御法開発・光解離機構解明（電気通信大学 小林グループ）

(1)研究実施内容及び成果

【研究目的】

細胞内情報伝達に關与する生理活性物質の作用機構を理解することは、生命現象の解明に直結し、現在人類が直面している問題を克服することができる。特に小林Gでは、この目的のために、極めて高安定性・エネルギー集中性・高品質空間コヒーレンスを有する新奇な高安定性高空間コヒーレンス波長可変多色レーザーを開発する。その優れた多色光源を顕微鏡と結びつけ、性能面で画期的な新奇な原理に基づく新非線形顕微イメージング法を開発する。具体的には、従来の自然放出蛍光イメージング法を改良した多色観察を行う方法論を開発する。即ち、多(128)チャンネル高感度検出ロックイン増幅器を用いた測定により、高信頼性のアンミキシングを行い多色同時検出のスペクトル分解性能・信頼性を向上させる。さらに、誘導放出による光増幅検出による誘導放出イメージング法(SEIM)法を開発して多色観察を行う。この原理をさらに誘導放出寿命イメージングとして特に多色 FRET 等に適用する。電子状態観察である、蛍光・誘導放出イメージングだけでなく、全く同じ実験装置を用いて分子振動状態観察である多色誘導ラマンイメージング法の開発も目指す。さらにその光源をイメージングにとどまらず、細胞・組織の生理機構・病理機構を解明する新しい多色光制御法を開発する。この際に、高効率で高安定な可視・近赤外光超短パルスレーザー、紫外超短パルスレーザー、深紫外-近赤外超広帯域超高感度超高速分光法をさらに高性能化する。それと共に、世界最高性能の超高速深紫外-紫外-可視-近赤外分光装置を開発しレーザー顕微鏡実用化時に問題となる光損傷機構を解明する。

【研究実施内容 1】 誘導放出光イメージング法

(1) 原理

励起光を試料に入射して試料中の分子を電子励起し、さらに蛍光波長と重なる別のレーザー光(プローブ光)を入射すると、誘導放出により検出光強度が増加する。これを顕微鏡下のナノスケールの空間分解能で行う測定が誘導放出顕微測定であり、ビーム位置を試料上で走査し各点でデータを所得することでイメージを得る。誘導放出イメージングは励起光により試料に与えられた光エネルギーをプローブ光で瞬時に取り除くため、蛍光イメージングに比べて光毒作用や褪色などの試料の光ダメージを抑えられる効果が期待される。また、誘導放出イメージングはポンプ-プローブ顕微イメージング法の一つで、焦点の光強度の強い部分にある分子を選択的に検出するため、通常の光学顕微鏡と比べて空間分解能が向上する。光軸(深さ)方向にも分解能を有しており、厚い試料の断層像や 3次元像を測定できる。有限のピンホールサイズをもつ共焦点蛍光イメージングと比べても、若干、空間分解能は向上し、より高コントラストなイメージが得られることが期待される。

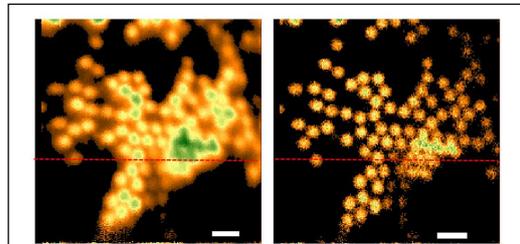


図 1.1 蛍光ビーズ(左)：従来の蛍光イメージ、(右)：SEIG イメージ

当初の計画では非線形光学過程により発生する波長可変多色レーザー光を顕微イメージング光源に使う予定であった。しかし波長可変多色光の発生にはチタンサファイア再生増幅器を必要とし、研究室の増幅パルスレーザーの繰り返しが 1kHz と低く、パルス間の強度安定性も誘導放出イメージングで必要とする性能に及ばなかった。そのため、定常発振の半導体レーザーを光源にして、誘導放出光イメージングを行った。その結果、予想通りの超解像性能が得られた(図 1.1,[D49])。半導体レーザーは小型・省消費電力で、近赤外・赤色・青色の素子に加え、近年は室温で高出力発振可能な緑色や黄色の発振波長をもつ素子が開発されており、様々なプローブ分子にも対応できるためレーザー顕微鏡の光源として最適である。また、従来のチタンサファイア再生増幅器を使った顕微システムと比べ光源のコストは 50 分の 1 以下で抑えられる。さらに光源

の煩雑な調整作業が必要なくなるため、生物系や医学系研究者などレーザー研究を専門としない研究者にも扱い実用的なシステムを構築することができる。この様に、初期の予想を超えた成果が得られた。また本研究では、半導体レーザー強度揺らぎを抑制するために、ロックイン検出法とバランス検出法を組み合わせることで、高感度・高空間分解な生体イメージングを実現した。

(2) 誘導放出光顕微(SEG)イメージング

本研究で開発した誘導放出顕微イメージング法では、励起光と検出光の強度をそれぞれ別の周波数で変調する。試料に入射したポンプ光は、誘導放出を介して検出光の透過率変化を引き起こす。この信号強度は通常、励起光強度と検出光強度の積であらわされるので、試料を透過した後の検出光には、元の変調周波数に加えて二つの周波数の和周波、差周波成分が含まれる。本実験では、信号の差周波成分をロックイン増幅器により検出した。さらに、自動バランス検出器を用いることで、レーザーの強度ノイズをショット雑音限界近くまでおよそ 20-30dB 程抑え、微弱な誘導放出信号を高感度で検出することができるようになった。SEG には SEIFIR(誘導放出誘起消光)、SEIG(誘導放出誘起増幅)、SLIM(誘導放出光寿命)の3モードがある。

図 1.2 に実際に生体試料を対象に測定した結果を示す。試料は河西 G で作成した YFP 蛍光蛋白質で標識した大脳皮質標本である。励起光には 488nm の LD、検出光には 532 nm のダイオード励起固体レーザー(DPSS)を用いている。バランス検出によるノイズキャンセルを行わない場合、相対強度雑音は 9.8×10^{-6} であるに対して、ノイズキャンセルした場合は 1.3×10^{-6} になり、ニューロンの樹状突起や軸索の構造を明確に観察することができた。さらにマウスの腸間膜リンパ節の CD8T 細胞と B 細胞を 525nm と 650nm に蛍光ピークをもつ二種類の量子ドットで標識した試料を対象に二波長の多重イメージにも成功した[D61]。また金ナノ粒子を使った測定から本装置の空間分解能の評価を行ったところ、光軸に垂直な平面で約 140nm であり、回折限界よりも高い空間分解能を得ることができた。

通常、誘導放出はプローブ光の相対強度変化を観察するので、原理的にプローブ光のショット雑音限界が信号・雑音比の限界である。我々は、バランス検出器を用いて、この極限の限界に達する誘導放出イメージングに成功した。誘導放出顕微イメージング法は、ピンホールサイズがゼロの共焦点顕微鏡と同じ空間分解能となるため、原理的には通常の共焦点蛍光イメージングと比べてコントラストが向上することが期待され、実際に確認された。

また励起光と検出光の変調周波数を変えながら信号の位相応答、振幅応答を測定することで、光励起状態に関する時間分解情報を得ることができる。これは周波数領域のポンプ-プローブ分光測定法であり、変調周波数帯域が時間分解能を決める。本装置は 1MHz から 1GHz の帯域があり、1 μ s から数百 ps の時間分解能を有する。蛍光ピーズを用いた実施例、蛍光寿命を正確に評価できることを確認した。このことは、信号分子間・高分子間相互作用などにより引き起こされた FRET 効果の研究に SLIM 法を適用することが可能であることを示す。

(3) 空間分解能の向上

本誘導放出顕微イメージング法で空間分解能をより向上させるために、様々な形状のビーム整形フィルタを導入した。光学顕微鏡の空間解像度は、光が対物レンズに入射したときの焦点面でのスポットサイズ(回折限界値)で決まるが、その強度分布は入射ビームの形状に依存する。円環状のビーム(ベッセルビーム)を対物レンズに入射すると、焦点面での光強度分布の主ピークは通常の円形ビームの場合と比べて鋭くなるが、主ピーク周辺に現れるサイドローブも強くなる。このときサイドローブからの寄与を抑えることで、空間解像度を向上させることができる。本発明は物質を光励起するポンプ光と、光励起による透過率変化を観測するためのプローブ光の2つの可視光の円環ビームを入射し、ポンプ-プローブ信号を検出することでサイドローブを抑制し解像度を向上させる方法である。ポンプ-プローブ法では観測される信号はポンプ光とプローブ光の強度の積に比例するため、強度の強い主ピークの中心部分に存在する分子から信号を優先的に検出することができる。また、サイドローブのピークの位置は波長に依存するため波長の異なる2色をポンプとプロ

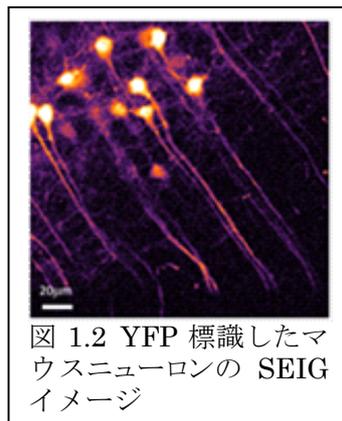


図 1.2 YFP 標識したマウスニューロンの SEIG イメージ

ープ光に用いることで、単一波長の場合と比べてサイドローブの寄与を約半分に抑制できる。理論計算から 2 色の円環ビームを入射したときにポンプ-プローブ信号を検出した場合、サイドローブは 10 分の 1 以下に減少し、同時に空間解像度は回折限界値に比べて約 2 倍近く向上することが理論的に得られた。実際に変調半導体レーザー光源を用いたポンプ-プローブ顕微法による測定を実施したところ、サイドローブはほとんど観測されず、理論計算からの期待通り空間分解能は通常の円形ビームと比較して 30%程向上することを確認した(図 1.3) [D49]。従来の光学顕微鏡との比較では約 2 倍空間分解能が向上している。また、この方法は蛍光性分子のみならず、以下で述べるフォトサーマル(PT)法により、金属ナノ粒子のような無蛍光分子の両方をに適用できることを確認した。一方で、円環ビームでは光軸(Z)方向の焦点深度が 2 倍程深くなるため、断層像や 3 次元像の測定には不向きである。そのため新たに逆輪体ビーム法を提案し、Z 方向の分解能を低下させずに XY 方向の空間分解能を 10-20%向上できることを確認し、この問題を解決した。

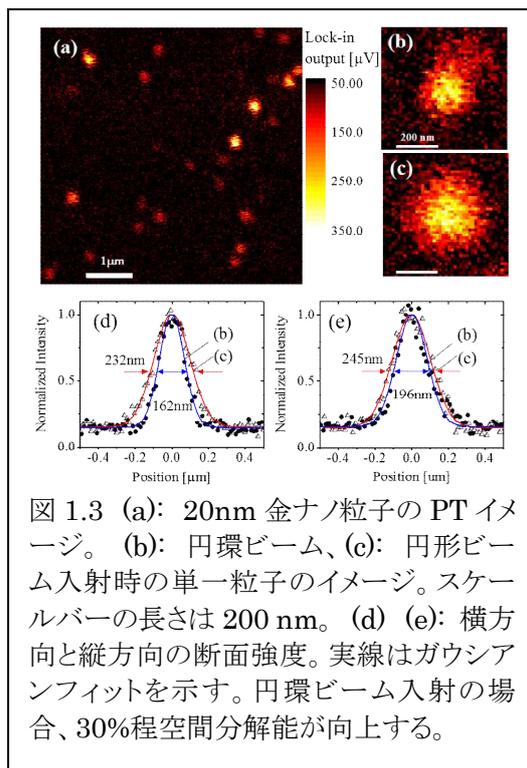


図 1.3 (a): 20nm 金ナノ粒子の PT イメージ。(b): 円環ビーム、(c): 円形ビーム入射時の単一粒子のイメージ。スケールバーの長さは 200 nm。(d) (e): 横方向と縦方向の断面強度。実線はガウシアンフィットを示す。円環ビーム入射の場合、30%程空間分解能が向上する。

[研究実施内容 2] 高解像・高感度フォトサーマル(PT)顕微イメージング法

(1) 原理

誘導放出イメージングでは、試料の吸収強度の変化を検出するが、同じ光学系で屈折率変化を検出することができる。光励起した分子近傍では通常、温度上昇により微弱な屈折率変化($\sim 10^{-4}$)が引き起こされる。(フォトサーマル効果)。このフォトサーマル(PT)効果を利用することで励起状態寿命の短い弱蛍光・無蛍光性の分子を検出することができる。本研究では半導体レーザーを光源とした高解像・高感度な PT 顕微イメージング法を開発し、様々な生体組織を対象に多波長・3 次元イメージングを行った。具体的には以下の研究成果をあげた。

(2) 高解像 3 次元イメージング

PT 顕微イメージングの空間分解能を表す点広がり関数は、通常、光軸方向に二重のピークをもつ。そのため、厚さのある試料を測定した場合、実際の構造とは異なる 2 重像を生ずるため注意が必要である。以前の研究では透過型共焦点配置により二重ピーク的一方を抑え単一ピークのみを検出する方法が提案されていた。しかしこの方法は共焦点(ピンホール)位置を厳密に調整する必要があり、生体組織などの不均一な厚さの試料を測定するには不適である。一方でポンプ光とプローブ光の焦点位置を光軸方向で少しずらすことで、二重ピーク的一方を抑えることができる。光軸方向の焦点位置は入射ビームの発散角により制御できるため、より簡単な光学系になる。本研究は後者の方法が高解像 3 次元イメージングに有用であることを明らかにした。具体的には、二重ピークを抑えるため焦点位置をずらしても回折限界のスポット径より高い 3 次元空間分解能が得られることを明らかにした。それにより皮膚がん組織(図 1.4)などの生体組織の高解像な 3 次元イメージを得ることに成功した(図 1.4, [D61])。従来の研究からメラニン顆粒の分布は良性・悪性腫瘍で異なることが報告されており、メラニン顆粒の分布を詳細に観察することで、より信頼性の高い良性・悪性判断ができるようになる。今までの診断

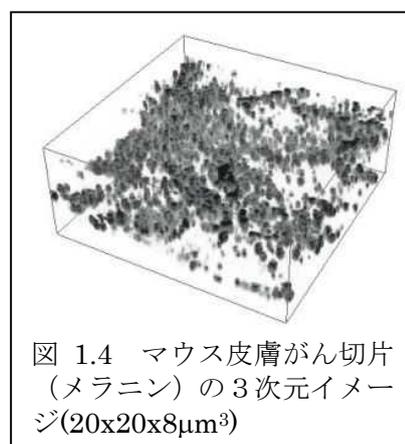


図 1.4 マウス皮膚がん切片(メラニン)の 3 次元イメージ(20x20x8 μm³)

は主に 2 次元の明視野像による観察が主であり、3 次元的で高解像で観察する方法がなかった。そのため本イメージング法が将来、より信頼性の高い診断法になる可能性がある。

(3) 信号対雑音比の向上

PT 信号の角度依存性を利用した高感度光検出法を開発した。PT 効果により屈折率変化している媒質中を伝搬する平面波は、進行方向とは別の方向へ偏向(散乱)される。対物レンズを介して入射する光は、試料を透過後、PT 効果により光強度が強くなる領域(透過光の中心部)と、弱くなる領域(辺縁部)に分けられる。従って、透過光の中心部と辺縁部を空間的に分けて別々に検出し、その後、二つの差分を計算することで、信号強度を2倍向上させ、同時にプローブ光のノイズを実効的に差し引きし除去することができる。半導体レーザーを用いた PT イメージング法では、通常の方法と比べて信号光強度は 1.7 倍向上し、一方、プローブ光の強度ノイズを 31dB 削減できることを確認した。これにより、ショット雑音限界の高感度イメージングが可能となった [D55]。これにより、細胞の中に微量に含まれているシトクロム等の色素タンパクを検出することができ、心筋や骨格筋のミトコンドリア(図 1.5)を無標識で 3 次元イメージングすることに成功した。そのため、細胞内でエネルギー産出を行うミトコンドリア形状や動態の解明、ミトコンドリアが関与する疾病の解明・診断など幅広い応用が期待できる。

(4) 同時多波長イメージング

PT 顕微イメージの信号強度は、通常、分子の吸光度に比例する。そのため、複数の波長の励起光を用いたスペクトラル(多波長)イメージングから分子の組成分析ができる。これまでごくわずかに報告されている PT 顕微イメージの研究例では、光パラメトリック増幅器を使った波長切り替え方式により多波長イメージングを行った研究例がある。しかし、この方法では波長を逐次切り替えてその都度、イメージングする必要があるため、測定に時間がかかる。また、温度ドリフト等により一連のイメージがずれてしまう場合、アンミキシング結果に大きな誤差を生ずる。そのため、複数の波長で同時に測定する同時多波長イメージングが求められる。

本研究では複数の波長の半導体レーザーを励起光源に用いて同時多波長色イメージングを実施した。このとき、励起光強度は波長毎に別々の周波数で変調し、信号として検出光に含まれるそれぞれの周波

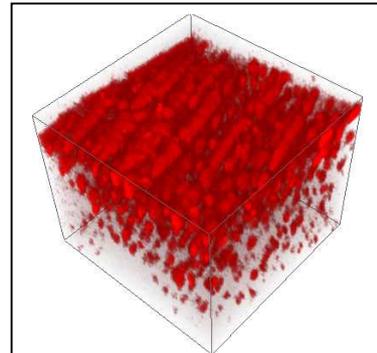


図 1.5 生きたラット骨格筋中のミトコンドリアの無標識 3 次元イメージ (20x20x20 μm^3)

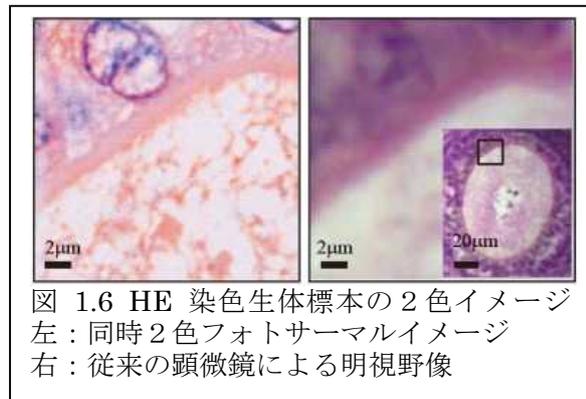


図 1.6 HE 染色生体標本の 2 色イメージ
左：同時 2 色フォトサーマルイメージ
右：従来の顕微鏡による明視野像

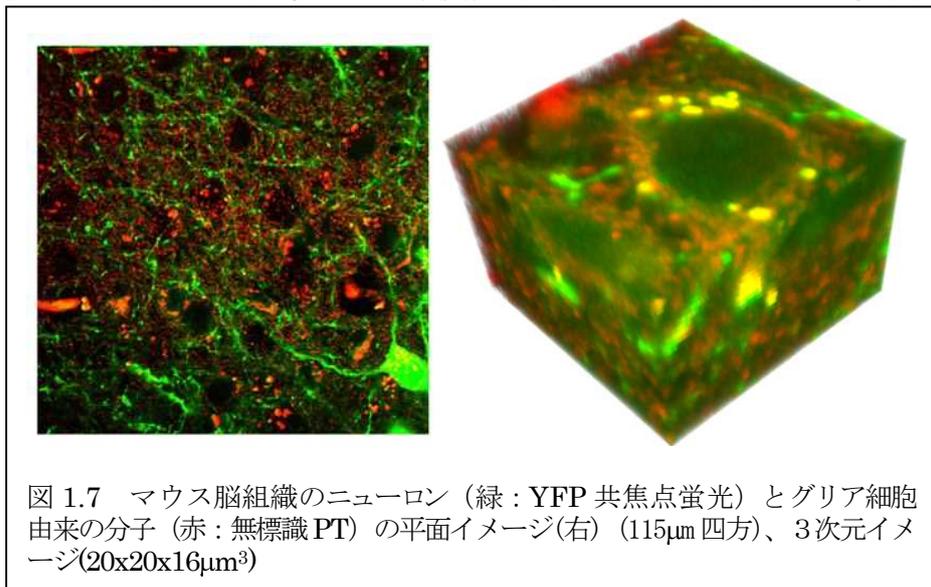


図 1.7 マウス脳組織のニューロン(緑: YFP 共焦点蛍光)とグリア細胞由来の分子(赤: 無標識 PT)の平面イメージ(右) (115 μm 四方)、3 次元イメージ(20x20x16 μm^3)

数成分を複数チャンネルのロックインアンプで復調することで多重化を行った。この方法で、実際に HE 染色したマウス卵巣切片を対象に同時2波長イメージングを行い、正確なアンミックス像を得ることに成功した(図 1.6)[D61]。今後の展開として、同時多波長イメージングにより、細胞内に含まれる種々の色素タンパク質の組成分析や、酸化還元状態の判断による機能解析などが見込まれる。

(5) 共焦点蛍光/PT 法による脳細胞イメージング

PT 顕微イメージは、同じ光学系で同時に共焦点蛍光イメージングを実施できる。従って、無蛍光性の分子は PT 法で、蛍光性の分子は共焦点蛍光法で同時検出することができ、蛍光性・無蛍光性分子を含んだ生体分子の網羅的な計測ができる。そこで、河西 G のマウス脳標本を対象に、PT法と共焦点蛍光法による同時イメージングを行った。励起光に波長 405 nm の半導体レーザーを用いた。共焦点蛍光法では、YFP で標識されたニューロンイメージが得られる。一方、PT 法で

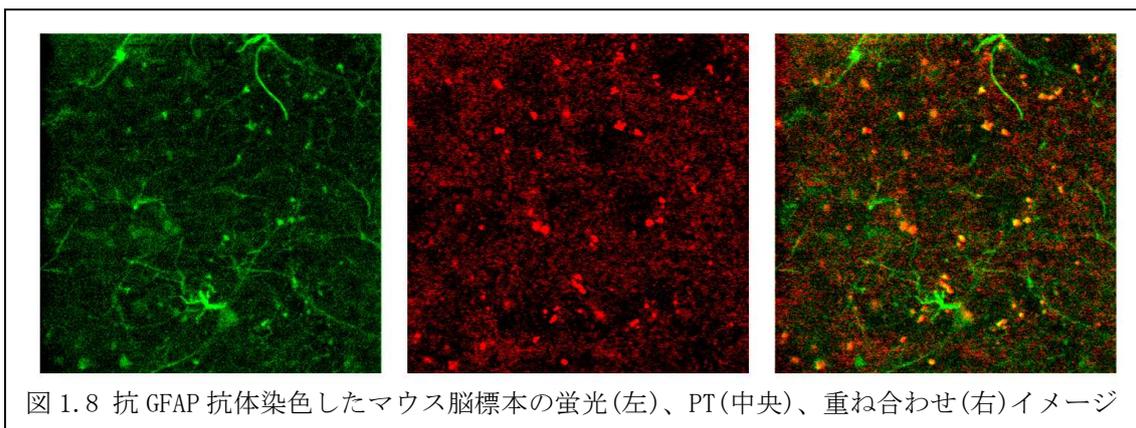


図 1.8 抗 GFAP 抗体染色したマウス脳標本の蛍光(左)、PT(中央)、重ね合わせ(右)イメージ

はニューロンとは明らかに異なる箇所からスポンジ状の空間分布をもつ信号検出された(図 1.7)。これは、グリア細胞の一種であるアストロサイトによく含まれているグリコーゲン顆粒によるものと推測される。このことを確認するため、アストロサイトを GFAP により蛍光染色した試料の蛍光・PT の同時イメージングを行った。蛍光イメージングでは特徴的な星形構造のアストロサイトが観察されるが、抗 GFAP 抗体はアストロサイトの一部を標識するだけで、実際のアストロサイトはスポンジ状構造でより広範囲に広がっていると考えられている。共焦点蛍光/PT の2重イメージングから PT 信号の分布は抗体染色法で観察される星形構造より広範囲に広がっていることが明らかになった(図 1.8)。このことは PT 法によりより正確にアストロサイト分布を見ていることを示している。また、アストロサイトのみならず、ミクログリアなど他のグリア細胞のイメージも現れていると考えられる。また広視野イメージングから、ヘモグロビンに起因した血球、血管ネットワークも可視化できる。このことは本測定法が神経細胞のみならず、グリア細胞と血管ネットワークを同時に可視化し脳の生理過程を包括的に明らかにすることができる有望な測定法であることを示している。現在、PT 法の高感度性を用いて非線形 PT イメージング法により解像度の 1.4 倍の向上が得られた。PT 信号の起源がグリコーゲン顆粒由来である事を直接的に証明するためのポンプ波長依存性の実験に取り組んでいる。このような手法が成功すれば、より複雑な組成を持つ生体系への応用が格段に広がることが期待される。

PT イメージで観察される点状構造がグリア細胞内のグリコーゲンからきているか直接確かめるために抗グリコーゲン抗体染色した脳切片標本の共焦点蛍光/PT イメージングを行った(図 1.9)。その結果、蛍光と PT イメージは全体的にはよく一致しており、PT 信号がグリコーゲンに由来していることを支持する結果を得た。グリコーゲ

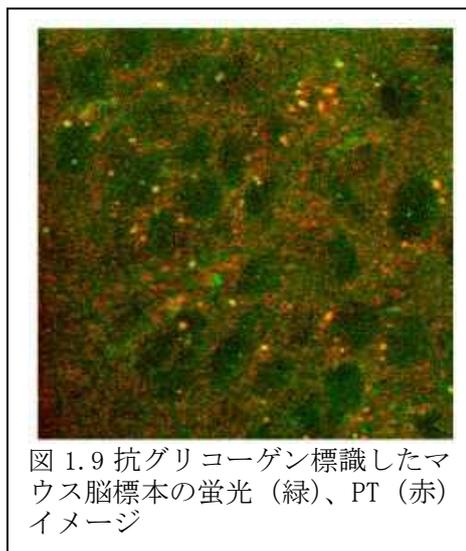


図 1.9 抗グリコーゲン標識したマウス脳標本の蛍光(緑)、PT(赤)イメージ

ンのみならず糖鎖、アミノ酸やたんぱく質などにも適用できるように、波長依存性を研究する予定である。今後、抗体染色や複数の波長の励起光による多色 PT イメージング法及び多モードイメージング法を用いて異なった構成要素

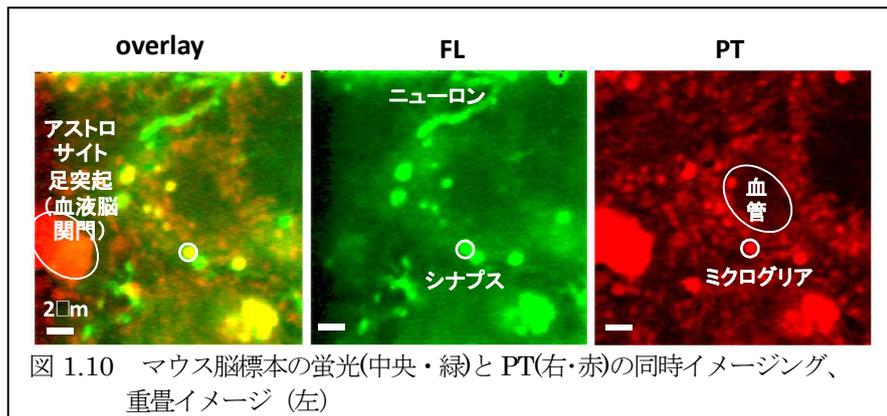


図 1.10 マウス脳標本の蛍光(中央・緑)と PT(右・赤)の同時イメージング、重畳イメージ (左)

素であるニューロン網、グリア細胞(ミクログリア、アストログリア、オリゴデンドロサイト)網、血管網を同時にイメージングしていく方向がこの研究の発展型として大いに期待される。

グリコーゲンは脳の機能に重要な役割を果たすと考えられているが、脳内のグリコーゲンの分布は今までに確実な染色法がなかったため、その詳細な機構はよくわかっていなかった。PT 信号がアストロサイト内のグリコーゲン由来と確認できれば、将来的にはグリア細胞(グリコーゲンを蓄えている)とニューロンとの相関解析、さらに血管網(ヘモグロビンを持つ)との関係を含めた包括的解析から、グリコーゲンが記憶などの脳の機能とどのように関係するか明らかにすることができる。

マウス脳標本の蛍光(緑色)と PT 法(赤色)の同時イメージングから、ニューロンで蛍光タンパクを発現した H-line マウスを対象としたイメージング(図 1.10)から、赤色と緑色は広域に渡って相互にかなり厳密に排他的であり、ニューロンの存在していない場所を稠密に PT 信号が埋めていることが分かる。このことから、ニューロンよりも細胞数で圧倒的に多数存在するグリア細胞が PT 信号の起源であると考えられる。これは 405nm のポンプ光の吸収による PT(1 分子でも検出可能な高感度な PT 法)イメージである。図 1.9(左)に示すように、血管にアストロサイトの足突起(白楕円)が接着し脳関門を形成している。更に興味深いことに、図 1.7・1.10 の 3 次元・2 次元イメージの中に例外的に赤と緑が重なっている所(図 1.10 の左・中央・右の白丸)が、全 3 次元像中に見られた。これは、これらの中でミクログリアが欠損ニューロン或いはシナプス・スパインを貪食している箇所と考えられる。後者の貪食されたスパインは、長期記憶に残らない(忘却過程を経ている)スパインである可能性がある。

本測定法を神経細胞の記憶形成過程や忘却過程の観察のためのより有効な方法へ発展させるには、生きた状態の細胞の観察が重要である。そのためスキャニングミラーを組み込んだ顕微鏡を新しく製作した。これにより一フレーム当たりの測定時間は数秒に短縮され、蛍光・PT 法の高速同時イメージングが実施できるようになった。予備実験として実際に生きたマウス骨格筋を対象に無標識 PT 3 次元イメージングを行い、本測定法が生きた細胞の測定に有効であることを実証することができた。今後の進展により培養脳細胞などを対象にして記憶形成過程や忘却過程における神経細胞とグリア細胞の相関をライブセルイメージングにより明らかにすることができると期待される。

(6) 非線形光熱(PT)顕微イメージング

フォトサーマル顕微鏡は、試料の吸収を高解像度で検出するポンプ-プローブ顕微鏡の一種である。強度変調されたポンプ光と、もう一つのプローブ光を対物レンズによって集光し、試料に照射する。ポンプ光が試料により吸収されると熱が発生し、試料の温度が上昇する。このとき、屈折率が温度上昇により変化するので、結果としてポンプ光は試料の屈折率を変調する。この屈折率の変化によって試料透過後のプローブ光の発散角が変化する。検出系に絞りを設置すると、このプローブ光の発散角の違いを強度の違いとして検出することができる。したがって、ポンプ光の強度変調周波数でプローブ光の強度変調をロックイン検出することで、ポンプ光強度に対して線形に変調された試料の屈折率変化を検出することができる。この方法では、信号強度分布関数がポンプ光とプローブ光の強度分布関数の積となるので、通常の蛍光顕微鏡に比べて空間分解能が向上さ

れる。さらに、試料の発光ではなく、吸収を観測するので、色素の選択の幅が広いことも特徴である。

本研究は、熱容量と熱伝導率が温度に依存することを利用して、空間分解能をさらに向上させたものである(図 1.11)。すなわち、熱容量と熱伝導率の温度依存性により、ポンプ光による試料の温度はポンプ光強度 (I_{pump}) に対して非線形に応答し、結果として、試料の屈折率変化も非線形に応答する。例えば屈折率の 2 次の応答による信号強度は、

$$S \propto I_{\text{pump}}^2 \cdot I_{\text{probe}} \quad (1)$$

となる (I_{probe} はプローブ光強度である)。この原理により、ポンプ光の集光スポットの、強度が大きな中央部分の信号が強調され、点像分布関数はポンプ光の点像分布関数の 2 乗とプローブ光の点像分布関数の積となる。その結果、通常の線形なフォトサーマル顕微鏡と比較して 18%の空間分解の向上が期待できる。これは通常の光学顕微鏡と比較すると、42%の空間分解能の向上に相当する。このような 2 次の非線形な信号を検出するためには、ポンプ光の変調周波数に対して 2 倍の周波数でロックイン検出すれば良く、通常のフォトサーマル顕微鏡の光学系を変更することなく、簡便に空間分解法を向上することができる。

非線形フォトサーマル効果を観測する顕微鏡システムの概要図を図 1.11 に示す。光源はパルス幅 100 ps、パルス繰

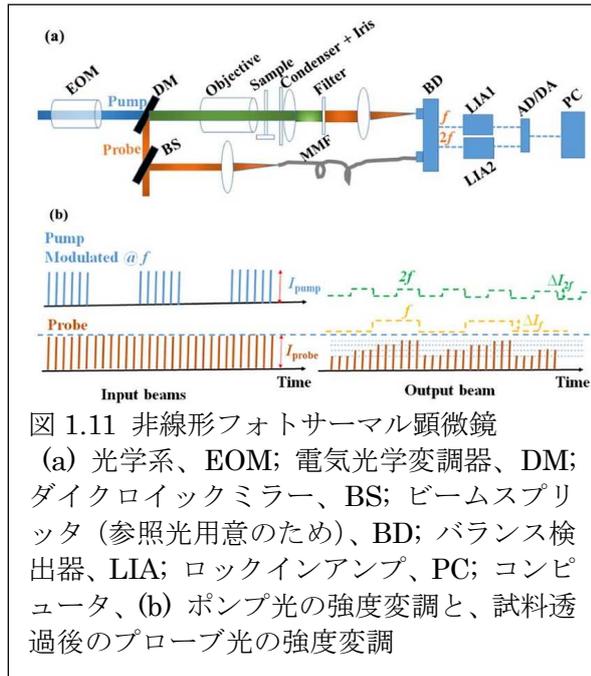


図 1.11 非線形フォトサーマル顕微鏡
(a) 光学系、EOM; 電気光学変調器、DM; ダイクロイックミラー、BS; ビームスプリッタ (参照光用意のため)、BD; バランス検出器、LIA; ロックインアンプ、PC; コンピュータ、(b) ポンプ光の強度変調と、試料透過後のプローブ光の強度変調

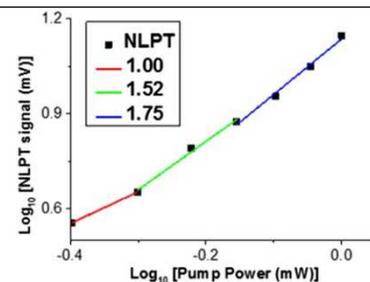


図 1.12 非線形信号のポンプ光強度依存性

り返し周波数 40 MHz の白色ファイバーレーザーである。白色パルス光から、ポンプ光とプローブ光として、それぞれ波長 488、632 nm の成分をフィルタにより用意される。ポンプ光は強度変調を与えられ、プローブ光と重ねられて試料に照射される。本システムではプローブ光の強度雑音を打ち消すために、プローブ光の参照光を用意し、参照光とプローブ光の差を検出する、バランス検出器を用いている。検出器からの出力を 2 台のロックインアンプに入力し、それぞれポンプ光の変調周波数と、その 2 倍の周波数でプローブ光の変調を同時観測した。

図 1.12 に対数プロット PT による非線形信号のポンプ光強度依存性を示す [D63]。ポンプ光強度が弱いところでは信号強度がポンプ光強度の 1 乗に比例しているが、これはポンプ光の強度変調歪による擬信号である。ポンプ強度が大きくなると、信号強度がポンプ光強度のおよそ 2 乗に比例する。これは試料の非線形な応答が擬信号以上に大きいためである。すなわち、1 mW 程度のポンプ

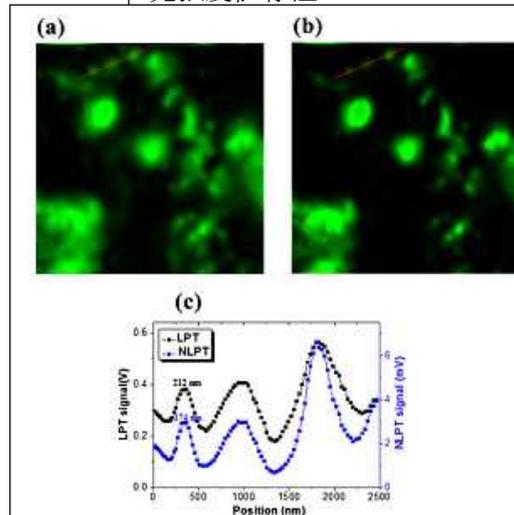


図 1.13 マウスのメラノーマのフォトサーマルイメージ
(a) 線形信号によるイメージ
(b) 非線形信号によるイメージ
(c) 赤線上の断面像、黒線; 線形信号 青線; 非線形信号

光パワーで十分に非線形な応答を観測可能であることが分かる。

図 1.13 に本顕微鏡で取得したマウスのメラノーマ(皮膚がん)のフォトサーマルイメージを示す [D63]。(a)は通常の線形信号によるイメージで(b)は非線形信号によるイメージである。(b)は(a)と比較して解像度が向上していることが分かる。(c)は(a)と(b)中に示した赤線上の信号強度で、図 1.13 の一番左の構造に着目すると、線形信号では半値幅 212 nm であるのに対し、非線形信号では 174 nm と、18%半値幅が小さい。この 18%の半値幅の減少は式(1)から予測される空間分解能の向上と一致している。この結果により、原理通り、非線形信号の観測により、解像度が向上することが実証されている。[D63]

[研究実施内容 3] 同時差し引き法超解像顕微鏡

(1)原理

超解像法の一つとして STED 法が知られている。この方法では、ガウシアンスポットで励起した蛍光をドーナツ状のスポットで誘導放出させ、ガウシアンスポットの中央部分のみの蛍光を検出することで超解像を達成する方法である。この方法では、ガウシアンスポットとドーナツスポットの波長が異なるので、多色化に制限があるといった問題がある。さらに蛍光を 9 割以上消光する必要があるため、ドーナツスポットにパワーが必要で、試料が破壊される危険性が高い。

STED 法と同じコンセプトによって超解像を達成する方法に FED(差引)法がある。この方法ではガウシアンスポット励起で得られた蛍光イメージから、ドーナツスポット励起で得られたイメージを計算機上で引く。STED 法と同じく、ガウシアンスポットの中央部の信号を得るという点でコンセプトは同じであるが、前者は誘導放出であり、後者は計算上であるという点で異なる。FED 法では差分を計算機上でとるので、ガウシアンスポットとドーナツスポットの波長は同一で良く、STED 法の多色化に対する制限が緩和される。さらに、ドーナツスポットも蛍光の励起に用いられるので、STED 法のように高出力である必要が無く、退色などの試料の破壊の可能性が抑えられる。従来の FED

法では、ガウシアンスポット励起のイメージを取得後にドーナツスポット励起のイメージを取得し、差を観測するので、それぞれのイメージを取得する時刻が異なる。その結果、装置の機械的要

因や移動する試料で、測定点がずれる可能性がある。その結果、得られる像に歪やアーティファクトを生じる。これは特に生きた生体試料などのダイナミックな試料観測に対する障害となる。本方法では実験時に同時に測定するガウスイメージ・ドーナツイメージの差分を取る方法であるので、その問題が全く無い。

(2)実験装置と方法

本研究法は、同時刻のガウスビームとドーナツビーム由来のイメージを得ることで、それぞれのイメージの位置が異なる問題を解決したものである。装置を図 1.14 に示す。光源をガウスビームとドーナツビームを得るために 2 分割し、双方を異なる周波数で強度変調する。片方のビームを位相板(VPP)に通し、ドーナツビームとする。双方のビームどうしが干渉しないよう、偏光ビームスプリッタ(PBS)上で偏光方向を直交させて重ねる。これらビームを顕微鏡に入射し、試料を励起する。2 つのビームによって励起された蛍光(黄色線で示す)を同時に検出する。検出信号を 2 台のロックインアンプ(2LIA)を用い、それぞれの周波数によって検波する。これによってガウスビームとドーナツ

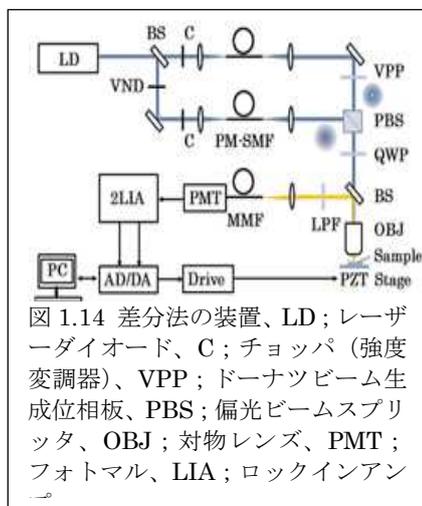


図 1.14 差分法の装置、LD；レーザーダイオード、C；チョッパ（強度変調器）、VPP；ドーナツビーム生成位相板、PBS；偏光ビームスプリッタ、OBJ；対物レンズ、PMT；フォトマル、LIA；ロックインアンプ

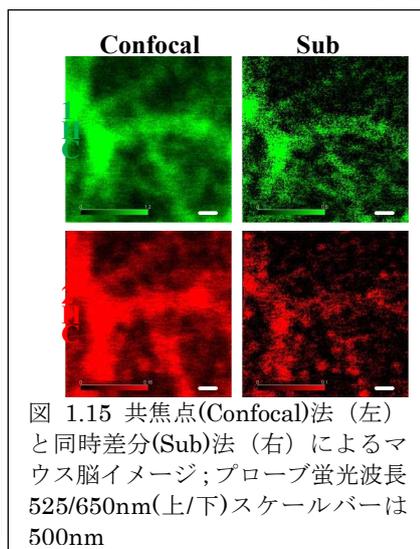


図 1.15 共焦点(Confocal)法(左)と同時差分(Sub)法(右)によるマウス脳イメージ；プローブ蛍光波長 525/650nm(上/下)スケールバーは 500nm

ナツビーム由来の同時刻のイメージをクロストーク無く得ることができる。本方法は特に、生体試料のような動的に変化する試料に有効である。[D58, 66, 67]

通常の共焦点蛍光顕微鏡と本装置によるマウス脳のイメージを図 1.15 に示す。解像度が向上し構造の強度分布の半値全幅は約 140nm であった。

[研究実施内容 5] 誘導ラマンイメージング

分子振動に基づく、無標識で試料のイメージングが可能な方法として、ラマンイメージングが知られている。この方法は、例えば標識分子よりも小さな薬物分子の動態計測など、標識で影響を受けるような試料の測定に適している。さらに、振動バンドは分子の凝集状態やコンフォメーションなどの化学

構造を鋭敏に反映するので、薬物による細胞膜などの化学的変化が検出できる可能性がある。

我々はフォトニック結晶ファイバー (PCF) で生成した白色光をプローブ光とし、試料透過後に分光して各々の波長のプローブ光のラマン損失を並列的にロックイン検出する SRS スペクトルイメージング法を開発した。特に図 1.16 に示す新奇バランス検出器を開発して感度を向上させた[Dd2,3,5,6,Df2,3]。

本方法を更に多色多モードイメージングに必要な多波長同時計測に適用するため、プローブ光/参照光 $pr \cdot rf$ の検出信号強度差が零になるよう同期信号の位相を帰還制御するようした(図 1.17) [D44,Dd6,Df3]。このとき、SRS 信号は打ち消すことが無いように、帰還制御の時定数は SRS の変調よりは長く設定する。これによって各波長で自動的にプローブ・参照光の検出信号強度比が等しく保たれ、多波長同時計測に適したものになる。また、1 ピクセルあたりの測定時間よりは時定数を短く設定することで、試料測定による $pr \cdot rf$ の検出強度比変化を補償できる。これによって $pr \cdot rf$ を試料の同一点に照射することは不要になる。さらに、散弾雑音限界による SN の下限を下げるため、適切な PCF を選択することにより、白色光の強度を向上させた。その結果、以前は 300 ms の時定数が必要であった PS ビーズのイメージが 30 ms の時定数で取得可能になった。さらに本検出器を 2 台用意することで同時 2 ラマン周波数 SRS イメージングを実証した[D51]。

また、 pr と rf の検出信号をそれぞれ同相・直交成分と捉えると、SRS による pr の強度変調はそれぞれの成分を重ねたキャリアの位相変調と考えることができる(図 1.18(a)) [D65]。この位相変調は光源の強度には依存しないため(図 1.18(b))、キャリアを位相検波することにより、SN が改善できる。この方法を実現するためには、SRS によって誘起される位相変調を、光源の強度雑音を含む強度変調と独立に検出する方法が必要である。その方法は、同期信号を帰還制御する時定数を SRS による強度変調周期よりも短くし、同期信号の位相がキャリアの位相と常に直交するようにして実現した。この時の帰還制御信号をロックイン検出することにより位相変調を強度変調(雑音)

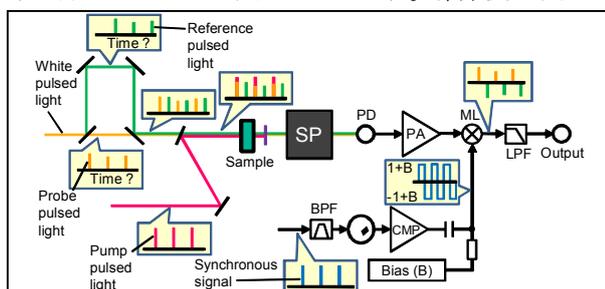


図 1.16 新奇バランス検出法、SP ; 分光器、PD ; 検出素子、PA ; プリアンプ、ML ; 乗算器、LPF ; ローパスフィルタ、BPF ; バンドパスフィルタ、 ϕ ; 移相器、CMP ; コンパレ

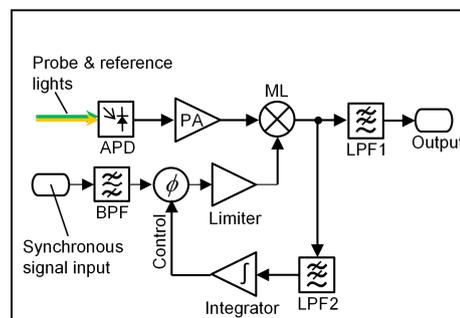


図 1.17 帰還制御付バランス検出器ブロックダイアグラム

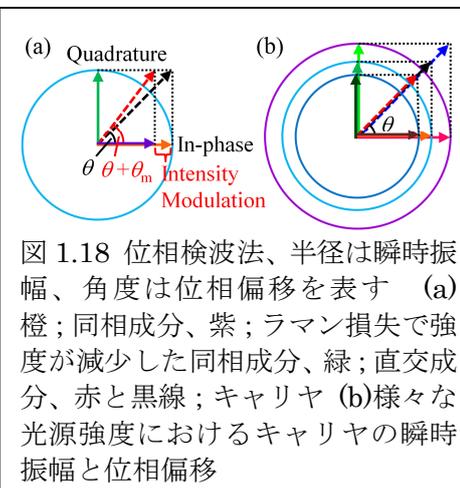


図 1.18 位相検波法、半径は瞬時振幅、角度は位相偏移を表す (a) 橙; 同相成分、紫; ラマン損失で強度が減少した同相成分、緑; 直交成分、赤と黒線; キャリヤ (b) 様々な光源強度におけるキャリアの瞬時振幅と位相偏移

とは独立に検出できる。この位相検波法は本質的に pr と rf の比を検出するので、 $pr \cdot rf$ の強度比乱れに対して堅牢である。従って、本方法は自動バランス機能では応答が難しい、不均一な生体試料を高速イメージングする際に強力な手段であるだけでなく、より広く微小変化検出器としての汎用性が高い。

[研究実施内容6]ポンプ・プローブ顕微鏡による3次元超解像イメージング

当研究室で開発を進めている顕微鏡は、ポンプ光(発振波長の一例 488nm)とプローブ光(一例 660nm)という2種類の連続発振型半導体レーザーを光源としている。それぞれの光に ω_1, ω_2 という正弦波強度変調を加えたのち試料に照射すると、試料内で実効的に非線型な相互作用によりそれらの差周波成分である $\omega_1 - \omega_2$ が生成される。この差周波成分をロックイン検出することでイメージングを行っている。差周波成分から検出される信号の点像分布関数は、ポンプ光・プローブ光それぞれの点像分布関数の積として表わせると考えられるため、従来型の蛍光顕微鏡に比べてXYZ方向ともに空間分解能を向上させることができる。本研究ではさらなる分解能向上を実現するため、逆輪帯照明法を導入した。逆輪帯照明法とは、ドーナツ形に光を遮断するフィルターを用いて、中心部と円環部のレーザー光のみを対物レンズへ入射させる方法である。この手法とポンプ・プローブ顕微鏡を組み合わせる事で、3次元方向に更なる空間分解能の向上が期待できる。原理実証のために金ナノ粒子の光熱変換イメージングを行った。その結果、信号強度の半値全幅がX軸方向 187nm、Y軸方向 219nm、Z軸方向 430nm となり、3次元方向すべてにおいて空間分解能が向上していることが確認できた。

[研究実施内容7] 光劣化初期過程機構の解明

分子の、光アンケージの機構である光解離・光劣化の機構を解明した。これまで測定出来なかった核酸塩基の「超短寿命励起状態の直接測定」に初めて成功した。これにより、細胞内の核酸塩基が太陽光の中の紫外光による励起下でも安定性を有する機構を初めて明らかにした。

[研究実施内容8] 光劣化初期過程機構の解明

カルコン化合物は生体物質として多く存在し、抗菌性や抗腫瘍性などの薬理活性を持つ。2'ヒドロキシカルコン(2'HC)はカルコン化合物の一種であり、紫外領域の光を吸収しフラバノンになる。フラバノンも抗菌・抗酸化作用などの薬理活性を示す。しかし2'HCについて時間分解分光はあまり報告されていない。そこで本研究では、過渡状態のフェムト秒オーダーの高速な緩和時間の観測と同定・構造変化の議論を目的として、紫外光領域(DUV)の時間幅 11 フェムト秒のパルスレーザーを励起光源とし、可視域スーパーコンティニューム光をプローブとして、その広帯域光を同時に信号検出できるマルチ(108)チャンネルロックイン検出器を用いて、カルコン化合物の超高速時間分解吸収分光を行った。その結果、3つの過渡状態における緩和時間を観測することができた。それぞれの緩和時間と対応する過程との同定のため次のことを行った。まず2'HCのヒドロキシ基を重水素化した分子で実験を行い、重水素化による緩和時間の違いを、量子化学計算の理論家と議論し、妥当な整合を見た。

[研究実施内容9]核酸塩基及びレーザー色素のインコヒーレント・コヒーレント過程のフェムト秒分光

本研究では、電気通信大学先端超高速レーザー研究センターで開発してきた深紫外(DUV)フェムト秒レーザーパルス光源として、ポンプ・プローブ分光法を活用し、物質の動的な過程及び非線形光学過程を研究した。このレーザーは分光研究用としては、世界最短パルス幅の DUV レーザーである。具体的な研究内容は、ポンパパルスとプローブパルスの間の異なる遅延時間領域における、光により誘起されたインコヒーレント及びコヒーレントな過程を研究対象とした。

ポンパパルス光がプローブパルス光より先に試料に到達する場合を正の時間帯領域と呼び、その逆を負の時間帯領域と呼ぶ。更に両パルスの曲出しが時間的に一致する場合を、ゼロの時間帯領域と呼ぶ。

まず、正の時間におけるインコヒーレント現象について、パルス幅 10 フェムト秒の深紫外レーザ

ーパルスの励起によって、核酸塩基分子の励起状態のダイナミクスを調べた。核酸塩基分子の中のウラシル分子とチミン分子の水溶液を実験対象として、-200 から 1800 フェムト秒までの時間範囲で 285nm-260nm(4.35eV-4.76eV)の時間分解差吸収スペクトルを測定した。

実験結果の解析によって、その時間分解差吸収スペクトルは 2 つの寿命成分寿命からなることがわかった。しかも、その2つの成分共に、その寿命の値がプローブ光の光子エネルギーに依存するという驚くべきことがわかった。

これら2成分の寿命の値は以下のとおりである。ウラシルの短寿命成分の寿命範囲は、4.35eV から 4.76eV までのプローブ範囲内で 48~115 フェムト秒とプローブ光子エネルギー依存性を有し、同じくウラシルの長寿命成分では 110~1640 フェムト秒のプローブ光子エネルギー依存性を有することが分かった。チミンの場合には、4.35eV-4.76eV の範囲で、短寿命成分 68~220 フェムト秒と長寿命成分 130~2210 フェムト秒である。

これらの寿命のプローブ波長依存性を示すスペクトルを、円錐交差(CI、Conical Intersection)を介する緩和過程として理解することが出来る。ウラシル、チミンの両方で測定値が 100 フェムト秒未満の最短時間定数が第一励起 S2(1 $\pi\pi^*$)状態から CI を通して、S1(1n π^*)状態への緩和過程に対応すると説明出来る。

二番目に短い時間定数は、プローブ光の光子エネルギーに依存し、約 100 フェムト秒から約 2 ピコ秒の範囲である。これは、S2状態が変形による S2d(1 $\pi\pi^*$)状態から二番目の CI を通して、基底状態 S0 への緩和過程によるものとして説明することができる。

これらの実験及び解析から、特に重要な結論として、下記のことが言える。

CI(S2-S1)とCI(S2d-S1)の位置を初めて実験的に決定した。それらはウラシルで各々 4.33eV と 4.36 eV である。チミンでは、各々 4.45eV と 4.36 eV であることを明らかにした、それに対応する CI の幅は各々 0.21 eV と 0.038 eV (ウラシル)、0.05 eV と 0.031eV (チミン)である。更に、励起分子の振動ダイナミクス現象も検討した。時間分解スペクトル及びスペクトログラム解析によって、主な振動モードの位相緩和と寿命と電子状態の分布緩和寿命がほぼ同じであることを発見した。これは、前者が、電子緩和によって同時に減衰することを意味している。すなわち、インパルスに励振されたコヒーレント分子振動は、励起状態の振動であることを示す。このことは、分子振動の初期位相が π であることから、証明される。

これまでの先行研究で用いられた深紫外レーザーパルスの幅は、最も短いものでもせいぜい 100fs 程度であり、全ての論文の結論は、短寿命成分の寿命は 100fs 以下ということ述べるに過ぎなかった。本研究は 1 桁高い時間分解能で研究した成果である。

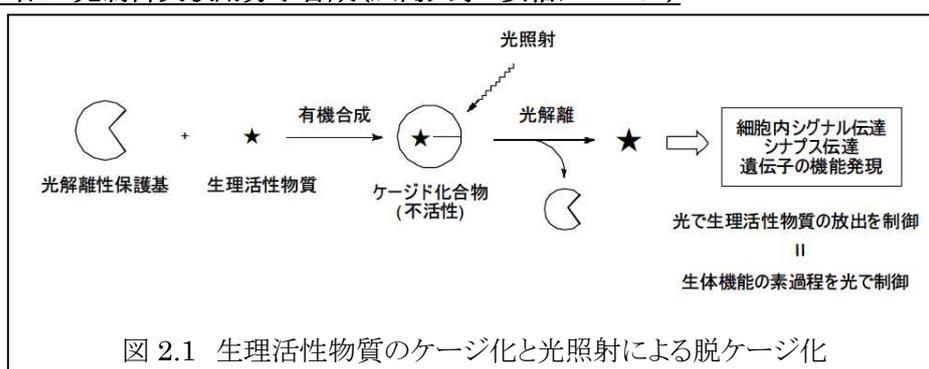
ポンプ光とプローブ光とが重なるゼロ遅延時間領域の現象について、非縮退二光子吸収(TPA)断面積測定する新しい方法を考案した。それにより、スーパーコンティニューム光(プローブ)と近赤外光(800nm,ポンプ)とを、マルチチャンネルロックイン検出することにより従来法より信頼性の高い結果が得られた。

検出されるプローブ光のスペクトル変化は二光子吸収断面積に比例し、TPA 係数を直接的に高い確度で計算することができる。本研究で用いた実験系の利点は、多チャンネルロックイン検出器という世界で唯一のロックイン増幅器を用いる点である。即ち、広帯域 TPA スペクトル領域の多く(128点)のスペクトル点の2光子吸収強度を、同時に測定することができることである。この同時計測により、これまで行われていたような、波長を1点1点変えながら測定する方法に比べて、圧倒的に小さい系統誤差で測定出来る。これを用いて、レーザー色素の非縮退二光子吸収断面積を測定した(具体的には、ローダミン 6G、ローダミン 123、クマリン 6、クマリン 343、ナイルレッド、とナイルブルー-A)。本研究で測定したレーザー色素(ローダミン 6G 以外)の非縮退 TPA 断面積の絶対値については、初めての報告である。ローダミン 6G の報告された縮退 TPA の結果と比較して、非縮退 TPA はその断面積の増強が確認され、理論計算との対応も良いことが判った。測定実験に使った溶媒によるラマン散乱現象も同時に出現することを見出した。このラマン信号とサンプルの TPA 信号との干渉及び区別方法について、考察しそれを取り除きその影響を受けていない2光子吸収スペクトルを得ることに成功した。

3.2 サブテーマ名2 光制御実験用分子合成(広島大学 安倍グループ)

【研究目的】

細胞内情報伝達に關する生理活性物質の作用機構を理解することは、生命現象の解明に直結し、現在人類が直面している問題を克服



することができる。生理活性作用機構を知る極めて有効な手法の一つとして、生理活性化合物のケージ化(活性関連部位の保護による非機能化)と光エネルギーを利用する脱ケージ化(機能化)が知られている(図 2.1)。この手法を用いることで、生理活性物質が活性を示す場所を制御することが可能となる。現在では、オルトニトロベンジル基 (caging group) でケージ化された ATP や IP3 などが市販されるようになっている。しかしながら、その発色団の脱ケージ化には、350-400 nm の高光子エネルギー光が必要となり、一重項酸素の発生や核酸塩基の光反応による細胞破壊が起こってしまう。その欠点を克服してケージ化合物を実用化するためには、高い光解離性(脱ケージ化効率)と2光子吸収を持つ細胞毒性が低いケージ化保護基(ケージド化合物)の開発が必要不可欠であるので、特に安倍グループでは、小林・河西両 G と密接に協力して、この目的のために、その化合物の開発を行う。

【研究実施内容及び成果】

【研究実施内容1】 拡張型クマリン骨格を有する新規光解離性保護基の合成とその光反応性 (研究業績:H1,2,5,14)

複雑な生体内反応を制御するために、生体内ではさまざまな情報の授受が行われている。情報伝達メカニズムを明らかにするためには、關与する分子(生理活性物質)が、いつ、どこで、どのように働くのかを知る必要がある。そのメカニズムを知る極めて有効な手段の一つとして、生理活性物質のケージ化(活性関連部位の保護による非機能化)と光エネルギーを利用する脱ケージ化(機能化)がある。光解離性保護基で生理活性物質を保護した化合物をケージド化合物といい、生理活性物質を保護したケージド化合物を使用することでその生理活性物質の発生を空間的・時間的に制御できるため情報伝達を人工的に再現でき、情報伝達のメカニズムを理解するのに有効な手段になる。これまでに神経伝達物質、タンパク質、DNA、mRNA 等のケージド化合物が報告されており、中でも神経伝達物質であるグルタミン酸のケージド化合物に関する研究は多数ある (T. Furuta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 96, 1193-1200)。しかしながら、水溶性が低い、核酸塩基と吸収波長が重なるなどの問題があるため、水溶性の増大と2光子反応性の向上など光解離性保護基の改善が必要である。

2光子吸収とは、一光子吸収の場合と比べて半分のエネルギーの光子を同時に二つ吸収して励起するもので、この現象を利用すればより精度の高い細胞実験が可能になる。レーザー光をレンズで絞ったとき、一光子励起では光が当たった分子すべてを励起してしまうが二光子励起の場合はレーザー光強度の高い焦点付近に存在する分子のみを励起出来る。水溶性を持ち、高い二光子吸収能力と反応性を持ち合わせた光解離性保護基の開発は重要である。

本研究では、2光子吸収能力が高いと考えられる拡張クマリン環を持つ化合物 **1** を基本骨格とした新規グルタミン酸ケージド化合物の合成と、その光物性評価および光反応性を検討し(図 2.2 [H5,14])、クマリン **1** を 1,6-ジヒドロキシナフタレンを出発原料として3段階、総収率 44%で合成した。

クマリン **1** が光反応でグルタミン酸を放出することを確かめるため、**1** の TFA 塩の光反応を、高圧水銀ランプを用いて NMR チューブ内、重メタノールを溶媒として行い、¹H NMR スペクトルを用いて反応の時間変化を観測した。その結果、1.5 時間後のスペクトルでグルタミン酸が確認された(図 2.3[H1,2])。

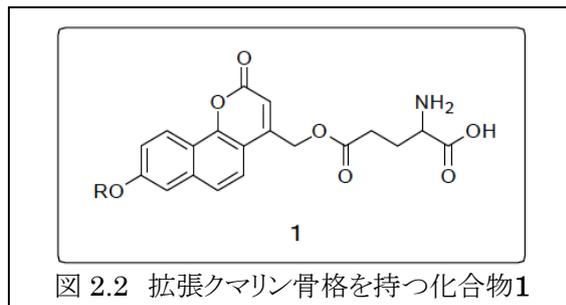


図 2.2 拡張クマリン骨格を持つ化合物1

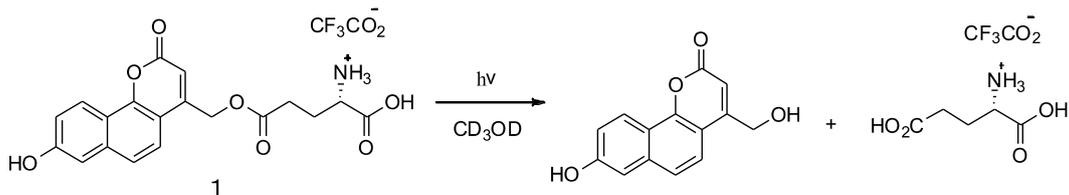


図 2.3 クマリン1の光照射による脱ケージ化反応

[研究実施内容2] 環状スチルベン骨格を持つ新規光解離性保護基の合成とその2光子吸収能(小林 G, 河西 G, 安倍 G の共同研究成果、研究業績:H22)

スチルベン骨格が比較的小さな π 電子系にも関わらず、大きな2光子断面積 12 GM at 512 nm を示すことが知られている。このことに着目し、我々は、光解離性保護基としてパラニトロ基を選択し、2光子吸収能を上げることに効果があることが知られている分子分極を増加させるために、アミノ基を導入した分子骨格 **2** に着目した(図 2.4)。

分子骨格 **2** の合成は、市販されている 4-ブロモフェニル酢酸からを開始し、鈴木-宮浦カップリング反応を経て、トータル 12 段階で合成した。その2光子吸収スペクトルを測定し、確かに近赤外領域(>700 – 1300 nm)に高い2光子吸収断面積(> 100 GM)を持っていることと、光照射により、グルタミン酸が乖離してくることを確認した[H22]。

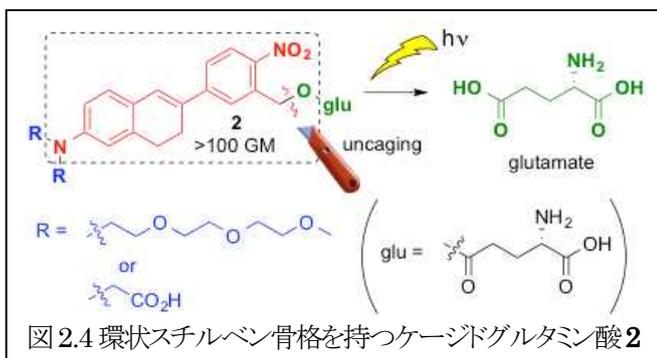
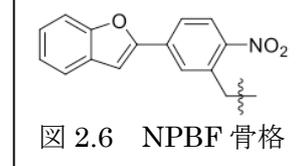
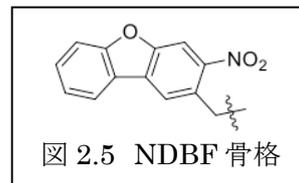


図 2.4 環状スチルベン骨格を持つケージドグルタミン酸 **2**

[研究実施内容3] ニトロフェニルベンゾフラン骨格を持つ新規光解離性保護基の合成とその2光子反応性(小林 G, 河西 G, 安倍 G の共同研究成果、論文執筆中)

光解離性保護基で生理活性物質を保護し非活性化したケージド化合物は、光照射により中性・無試薬条件化で自在に生理活性化合物を放出でき、時間的・空間的に制御することができるため、ケージド化合物を組織や細胞内に取り込んでおけば生理活性物質の役割を調べることが可能である。さらに、光解離性保護基が2光子吸収能を持つケージド化合物であれば、生理活性物質の放出をより空間的に制御する事が可能となる。

2006年、Ellis-Davisらは、2光子吸収能を持つカルシウムのケージド化合物として、ニトロジベンゾフラン骨格(NDBF)を有する光解離性保護基の開発に成功した(図 2.5)。しかしながら、NDBF骨格の1光子吸収の極大吸収波長は 330 nm 付近に存在し、生理学実験に



適した近赤外領域での 2 光子反応性は低く(～0.6 GM)改良が必要である。

本研究では、スチルベンが比較的高い二光子吸収能(12 GM)をもつことに着目し、より生理学実験に適した波長領域に極大吸収となる波長を持ち、かつ、高い 2 光子吸収能を持つ新たなスチルベン骨格を持つ光解離性保護基を設計・

合成し、その光化学的性質を精査した。

光異性化が起こらないようにトランス体で固定したいくつかの架橋スチルベン骨格に対して量子化学計算を行い、目的の骨格を絞り込んだ。その結果、近赤外領域に強い 2 光子吸収能を持ち、酸素原子で架橋されたニトロフェニルベンゾフラン骨格(NPBF)が最適であると判断した(図 2.6)。

NPBF 骨格の光化学的性質を調査するために、安息香酸を縮合させた NPBF 誘導体(NPBF-BA) **3** を合成し、また、比較対象分子として発色団のみが異なる NDBF 誘導体(NDBF-BA) **4** を合成した(図 2.7)。得られた **3** および **4** について室温における DMSO 溶液中での 1 光子励起および 2 光子励起による光反応を行った。

【結果と考察】キセノンランプを用いて 360 nm の光を NPBF-BA **3** に光照射を行った結果、時間経過とともに安息香酸の放出される過程が ¹H NMR により確認された(図 2.8)。この結果から NPBF 骨格はケージド化合物として機能を果たすことが確かめられた。

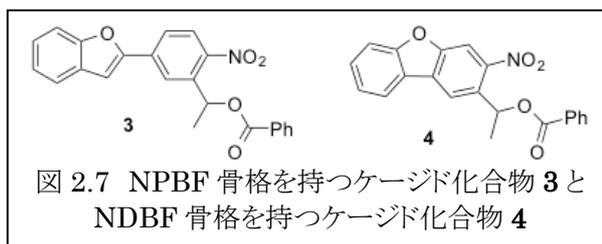


図 2.7 NPBF 骨格を持つケージド化合物 **3** と NDBF 骨格を持つケージド化合物 **4**

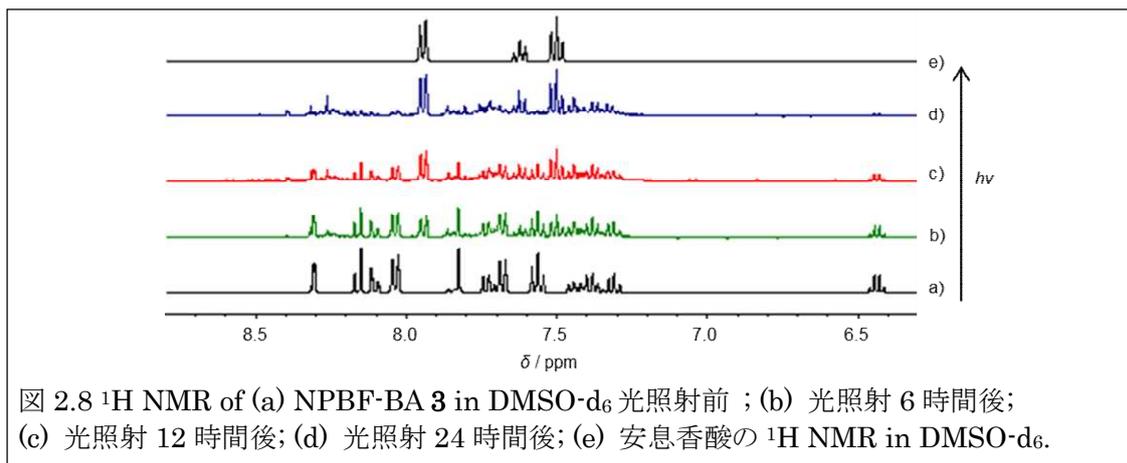


図 2.8 ¹H NMR of (a) NPBF-BA **3** in DMSO-d₆ 光照射前 ; (b) 光照射 6 時間後 ; (c) 光照射 12 時間後 ; (d) 光照射 24 時間後 ; (e) 安息香酸の ¹H NMR in DMSO-d₆.

また、チタンサファイアレーザーを用いて 720-760 nm の近赤外光を **3** および **4** に照射し、HPLC 解析により光反応を追跡した。750-760 nm での NPBF-BA **3** の光反応速度は NDBF-BA **4** よりも約 2 倍速く、この結果は発色団である NPBF が NDBF よりも近赤外領域において高い 2 光子反応性を持つことを示している(図 2.9)。

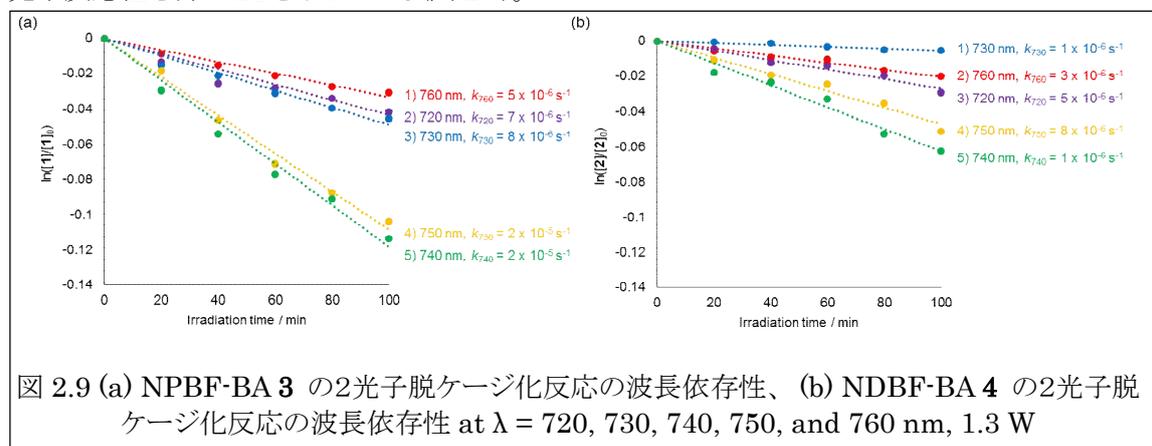
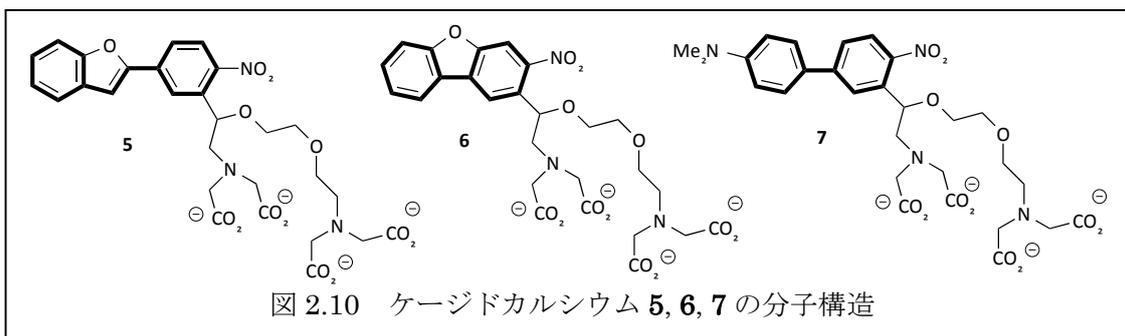
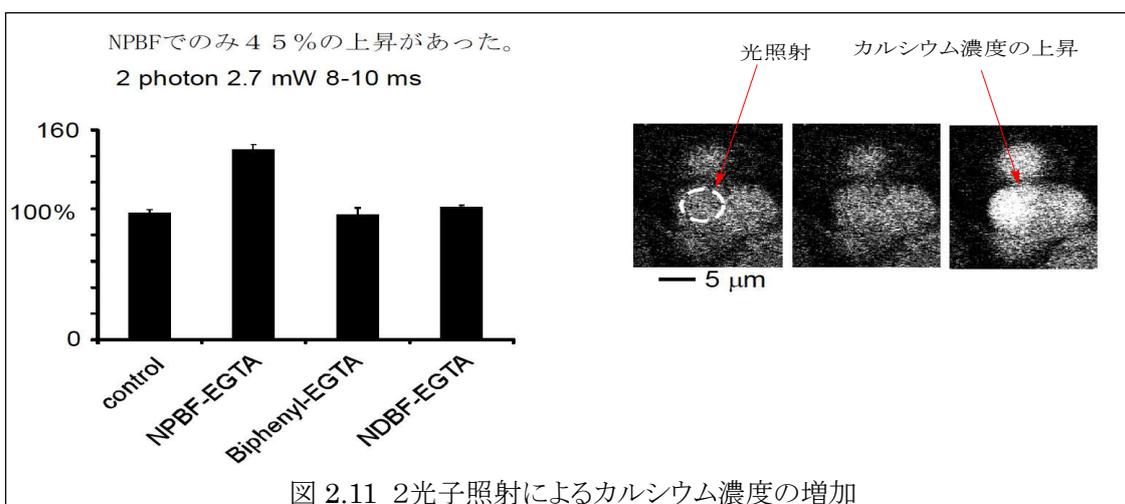


図 2.9 (a) NPBF-BA **3** の 2 光子脱ケージ化反応の波長依存性、(b) NDBF-BA **4** の 2 光子脱ケージ化反応の波長依存性 at $\lambda = 720, 730, 740, 750, \text{ and } 760 \text{ nm}, 1.3 \text{ W}$

[研究実施内容4] ニトロフェニルベンゾフラン骨格を持つ新規ケージドカルシウムの開発と生理学実験への応用(特許取得、小林 G, 河西 G, 安倍 G の共同研究成果、論文執筆中)



上記③の研究成果に示したように、本 CREST 研究で開発した2光子解離性保護基 NPBF を有するケージドカルシウム **5**(= NPBF-EGTA)を合成し、生理学実験に実際に用いた(図 2.10)。今回の実験では、ビフェニル骨格を持つケージドカルシウム **7**(= Biphenyl-EGTA)も使い、それらの比較を行った。その結果、これまで、用いられてきた NDBF 骨格を持つケージドカルシウム **6**(= NDBF-EGTA)よりも優れた性質を示すことがわかった(図 2.11)。最終年度にあたる今年度の前半で小林 G と河西 G との共同研究で開発した NPBF-EGTA の Ca²⁺の解離定数(Kd)は 272 nM であり、脱ケージ化反応の量子収率は 0.3 であった。脱ケージの量子収率を 0.7 以上にする分子設計を行い、生理学実験に最適な新規発色団の開発 を後半に当たる9月から開始した。今年中には、合成を終了し、小林 G が保有する fs 秒レーザーを用いて、2光子吸収スペクトルの測定を実施し、最適な2光子波長を見出して、河西 G での生理学実験に用いる。



3.3 サブテーマ名3 光イメージング・光制御実験 (東京大学 河西グループ)

(1)研究実施内容及び成果

【研究目的】

細胞内情報伝達に關与する生理活性物質の作用機構を明らかにすることは、生命現象の理解に必須であり、疾患の解明に必要であり、これには光イメージングだけでなく、光刺激法が有効である。河西 G では、2光子イメージング法及び2光子脱ケージ法を用いたシナプス可塑性等の研究実績に基づいて、光刺激法を駆使した生命現象の応用を更に開拓する[内容 1]。また、安倍 G、小林 G と緊密に協力し、高効率光ケージド試薬を用いて、生物研究に応用できる試薬を開発する[内容 2]。また、蛋白性の光刺激分子をも用いた光遺伝学は、遺伝子導入が可能なので、その応用が開けている。そこで、光遺伝学手法とケージド試薬を組み合わせた実験の応用例や[内容 3]、新たな光遺伝学プローブの応用開拓を行う[内容 4]。一方、小林 G では、新しいポンプ・プローブ

光学顕微鏡が開発されているので、この神経科学への応用可能性をその早期から検討して支援する[内容 5]。

[研究実施内容 1] 多色レーザーによるケージド試薬の活性[T4]:

これまで、複数のケージド試薬を有効に医学、生物学に同時使用した例は皆無であった。我々は、2光子励起による2色刺激法の確立に取り組んでいる中で、グルタミン酸は2光子、抑制性の GABA は1光子励起で行う選択が最善であることに気がついた。すなわち、グルタミン酸受容体がサブミクロンに局限して存在するのに対して、GABA 受容体は比較的分散して分布するので 1光子の方が、都合が良い場合がある。本研究では、多色刺激法の応用開拓のために、この手法による神経科学上の問題の解決を狙った(図 3.1)。

スパインシナプスはスパイン形態が結合強度をよく反映し、結合強度が強くなる時には、大きくなり、その変化は個別可変であり、脳の記憶素子と考えられている。しかし、結合強度が弱くなると、どのような形態変化が起きるか不明だった。これには抑制入力に関与があることも遠隔には示唆されていたが、旧来の電気刺激ではグルタミン酸受容体と GABA 受容体を独立に刺激できず、この問題の解決は先送りされてきた。そこで我々は、開発した2色刺激法をこの問題に応用した。

グルタミン酸刺激とそれに引き続く回路の動作(活動電位の発生)を起こしただけでは頭部増大は起きるが、どうしても収縮は起こすことができなかった。しかし、この時、GABA のアンケーシングをグルタミン酸で刺激したスパイン近傍で行うと、刺激したスパインが収縮することがわかった。収縮が起きたほとんどの場合、収縮は側方に広がり、隣接シナプスの収縮度が高かった。そこで、隣接するスパインに増大刺激を入れると、収縮に抗して増大が起きることがわかった。即ち、隣接スパインは収縮の広がりを通して競合しており、より適切な結合のみが増強され残り、不適切なシナプスや使われていないシナプスは除去されることが分かった(図 3.2)。こうして、抑制入力はシナプスの整理を促進することになる。この GABA の作用は樹状突起の活動電位に伴うカルシウム上昇を抑制することにより、これまで教科書的に考えられてきた活動電位の発生の抑制ということとは異なり、

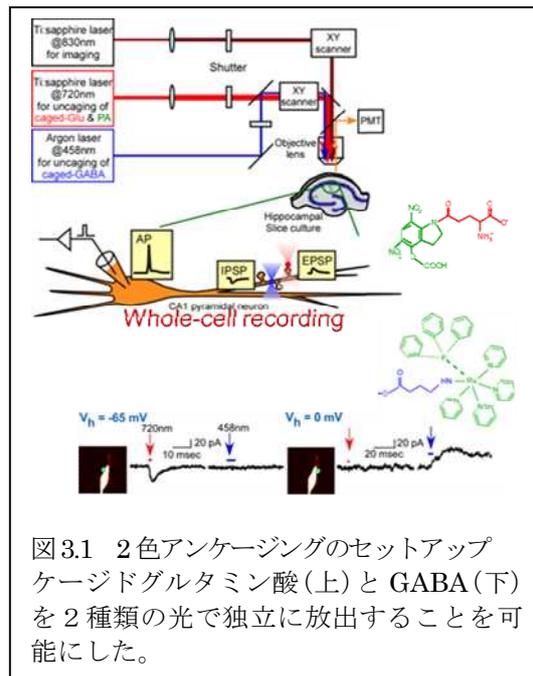


図 3.1 2色アンケーシングのセットアップ
ケージドグルタミン酸(上)と GABA(下)を2種類の光で独立に放出することを可能にした。

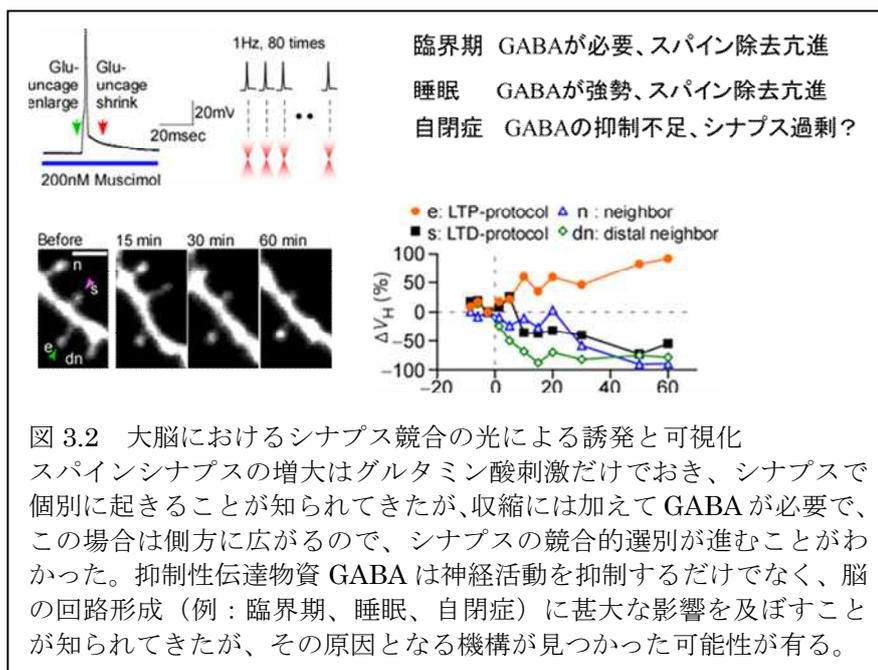


図 3.2 大脳におけるシナプス競合の光による誘発と可視化
スパインシナプスの増大はグルタミン酸刺激だけでおき、シナプスで個別に起きることが知られてきたが、収縮には加えて GABA が必要で、この場合は側方に広がるので、シナプスの競合的選別が進むことがわかった。抑制性伝達物質 GABA は神経活動を抑制するだけでなく、脳の回路形成(例：臨界期、睡眠、自閉症)に甚大な影響を及ぼすことが知られてきたが、その原因となる機構が見つかった可能性が有る。

もっと直接的に神経回路の組み替えを促進していることが明らかとなった。

【研究実施内容 2】 新規ケージド試薬の応用：

これまで小林・安倍 G と協力して新しいケージド試薬の合成に取り組んできた。その中で、ケージドカルシウム試薬の改良が成果を結びつつある。ケージドグルタミン酸や GABA は伝達物質のケージド試薬であり、これを用いるとシナプス前部がなくともグルタミン酸や GABA の放出を模倣することができるため、これらのケージド試薬によってシナプスの理解が著しく進んだと言える。

一方、シナプス前部の機能をカルシウム依存的な伝達物質の開口放出である(図 3.3)。脳の典型的なシナプスにおいては、これは小さく、細胞内から直接刺激するのは困難であった。そこで、この刺激となるカルシウムを放出するケージドカルシウム試薬の AM エステル版を安倍 G が合成し、これを用いてシナプス前部を直接刺激することを試みた。まず、紫外線で1光子励起して、シナプス後細胞から記録すると、ミリ秒の速い開口放出が記録されることがわかった(図 3.4(1))。

この測定は比較的簡便に行えるので、開口放出に直接的に関与する分子(SNAP25)の働きを解析するためにその分子を欠失したノックアウト動物を用いて、これに外来の遺伝子(変異 SNAP25)を発現させることにより、変異の効果をアッセイする系として使えることがわかってきた。たとえば、ノックアウト動物に正常な蛍光標識付き SNAP25 を発現させると速い開口放出

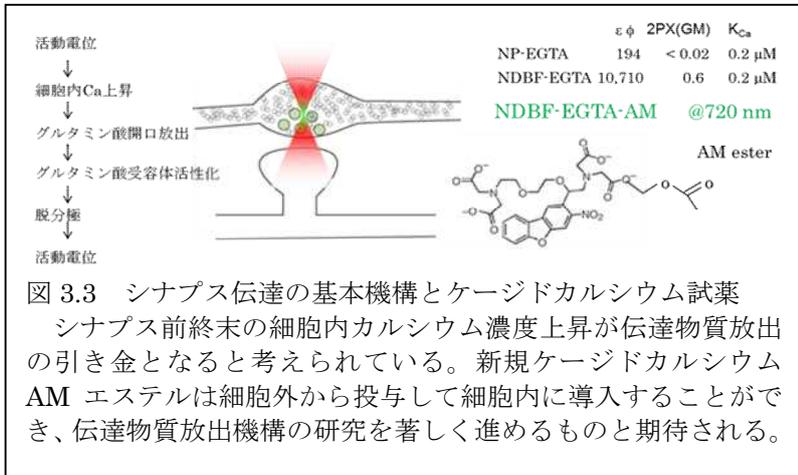


図 3.3 シナプス伝達の基本機構とケージドカルシウム試薬
シナプス前終末の細胞内カルシウム濃度上昇が伝達物質放出の引き金となると考えられている。新規ケージドカルシウム AM エステルは細胞外から投与して細胞内に導入することができ、伝達物質放出機構の研究を著しく進めるものと期待される。

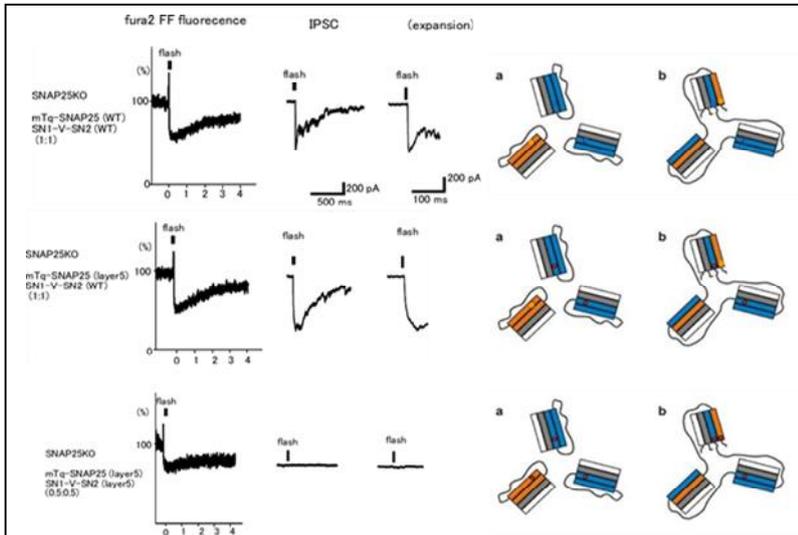


図 3.4(1) シナプス前終末の超高速開口放出

シナプスからの伝達物質放出が活動電位が到来後 1ms という時間で高速に起きるのは、脳が高速に動作することの基盤であり、また、シナプスの伝達効率の調節とも関わり、神経科学の永遠の課題の一つである。シナプスの開口放出を調べるのが難しいのはシナプス前終末が著しく小さいからである。

今回、ケージドカルシウムの AM 体を負荷することで、比較的容易にシナプス前終末を光り刺激することが可能になった。そこで、開口放出関連蛋白質 SNAP25 を欠失した動物から培養標本を作り、そのシナプス伝達を定量的に測定する系を構築した。SNAP25 の持つ 2 つの SNARE モチーフのどちらから一方に変異を入れても、正常遺伝子と分泌に差が出ない(上段、中断)。ところが、この 2 つの遺伝子を 1:1 に混ぜて発現させると、分泌は全く起きなくなった(下段)。これは、SNAP25 の 2 つの SNARE モチーフが組み合わさって SNARE 複合体が形成されることを強く示す(図 b)。この様な、超分子構造を取ることで、超高速開口放出が達成される可能性がある。

がおきた[T15]。

この SNAP25 は他の 2 つの SNARE 分子 (synaptotagmin, VAMP2) と 3 量体を形成することで開口放出を起こすと考えられている。SNAP25 は 2 つの SNARE 結合領域を持ち、SNARE 複合体は計 4 つの SNARE 結合部位が複合することで膜融合を起こすと考えられる (図 3.4(1))。この複合化状態は SNARE 分子に FRET probes を融合させておくと、蛍光寿命画像により知ることができ、SNAP25 の 2 つの SNARE 結合部位は異なる SNARE 複合体に入ると我々は蛍光寿命解析から割り出していた。この様な超分子構造を domain swapping という。そこで、これを機能的に検証するために、同一 SNARE 複合体内の 2 つの SNAP25 の SNARE 結合部位の両方に変異があると分泌を起こさなくなる変異のそれぞれを 2 群の SNARE 分子に入れて、遺伝子導入を行った。この結果、1 種類の変異のみを入れた場合には開口放出をほとんど変えないのに対して、2 種類の変異種を混ぜて発現させると、開口放出がほとんど起きなくなることがわかった。2 種類の変異種がそれぞれ同一の SNARE 分子を形成する場合には、SNARE 複合体には 1 つしか変異が入らないため開口放出は影響を受けないはずである。これに対して、SNAP25 が 2 つの SNARE 複合体を結合する場合には同一の SNARE 複合体に 2 つの変異が入るので開口放出は阻害されるはずである。この様に実験結果は domain swapping を強く支持した。従って、神経終末においては、SNARE 複合体は SNAP25 のリンカー配列で結ばれており、これが超高速開口放出には必要である可能性が高い。現在このリンカー部分の必要性を更に検証する実験を、ケージドカルシウム試薬を用いて進めている。

更に、この手法は 2 光子励起にも応用可能であり、研究の方向性が正しいことが証明された。即ち、2 光子対応ケージド Ca^{2+} 試薬の AM-ester を大脳皮質培養系に負荷し、シナプス前部を光刺激し、パッチクランプした細胞からシナプス後応答を得ることに成功した。図 3.4(2) では 1ms@720nm の 2 光子励起で多数の青い点をマップした (拡大図)。マップを 100 回繰り返すと、5, 11 及び 67 回目に樹状突起の一点 (矢印) でシナプス後応答が得られた。この応答率は概して 0.03 位だが、電気刺激では 0.2-0.6 に達する。この方法論の原理的な有効性が示された。本年度になって、安倍 G が合成された NPBF-EGTA-AM を用いた場合、100 回中 6 回まで応じる改善が得られている (河西 G 安倍 G 小林 G として共著論文準備中)。

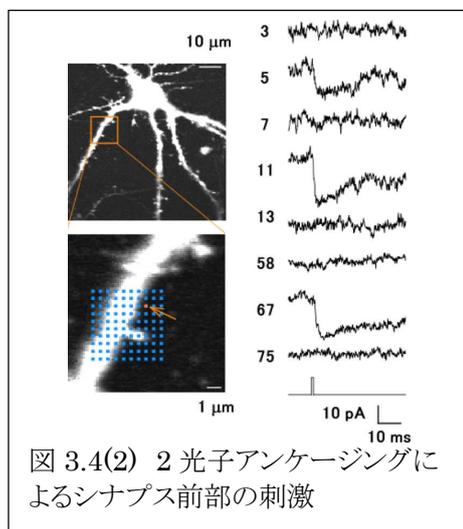


図 3.4(2) 2 光子アンケーシングによるシナプス前部の刺激

[研究実施内容 3] ケージド試薬と光遺伝学による光刺激法の応用開拓: [T13]

河西 G は、自ら開発した 2 光子グルタミン酸アンケーシング法でグルタミン酸入力を刺激するのに加えて、青色光で神経細胞を興奮させるチャンネルロドプシン (ChR2) をドーパミン細胞に発現させ、これら 2 種類の神経繊維を別々に刺激する実験系を初めて確立した。この方法を大脳基底核の側坐核に応用することにより、グルタミン酸作動性のシナプスの起こす可塑性をドーパミン入力がある様なタイミングで修飾するか調べた (図 3.5)。この結果、ドーパミン入力はグルタミン酸作動性の回路の活動に遅れて 0.5 秒から 2 秒以内に入力した時だけスパイン頭部増大を起こすことがわかった (図 3.6)。

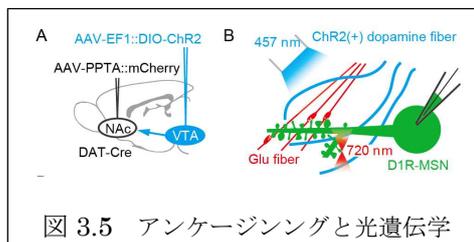


図 3.5 アンケーシングと光遺伝学

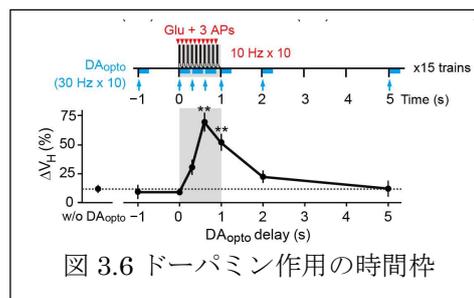


図 3.6 ドーパミン作用の時間枠

ドーパミンは脳内報酬信号と考えられており、これは報酬が行動に引き続く短い時間枠でとりわけ有効であるという、1世紀前にパブロフやソーンダイクの行動実験を説明できる基盤と考えられた。このような基盤がこれまで未解明であったのは、2種類の繊維を分離して刺激することができなかつただけでなく、その様な時間枠を生物学的に予想することができなかつたからである。我々は、その基盤が細胞にあることがわかったので、その分子基盤を、蛍光イメージングにより調べた結果、この時間枠はプロテインキナーゼ A の上流で作られており、環状 AMP の産生に関わるアデニル酸シクラーゼがグルタミン酸刺激による細胞内カルシウムの上昇で準備され、この後の狭い時間枠にドーパミンがこの酵素を活性化するという順序機構により、環状 AMP の十分な生成により、プロテインキナーゼ A が活性化し、スパイン頭部増大を許可することによることを見出した(図 3.7)。この様に、1世紀に渡って不明であった条件反射の分子機構を解明した。

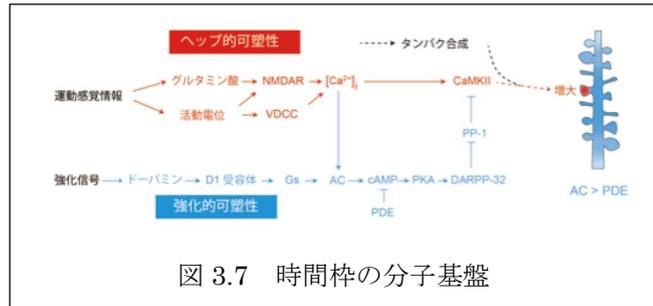


図 3.7 時間枠の分子基盤

[研究実施内容4]

シナプスに光遺伝学を応用して個体レベルの記憶のメカニズムを可視・操作手法で解明: [T14,15]

大脳皮質の樹状突起スパインは学習・記憶に応じてその形態・サイズが劇的に変化し、それに伴い電氣的伝達効率が変化します。大きなスパインには多くの受容体が存在し、すなわちシナプス結合が大きく、一方、小さいスパインはシナプス結合が小さいことが知られている。さらに小さなシナプスが大きなシナプスへ変換する際には(長期増強)、シナプス結合強度も大きくなることが知られている。スパインは興奮性神経細胞の接続部の大部分を形成するので、スパインが新しく形成されたり、またその大きさを変えることにより、どの脳神経回路にどの程度の電気信号が流れるかが大きく変化する。それゆえにスパインが脳神経回路の記憶素子と考えられ、学習・記憶の細胞基盤であると推測されてきた。しかし生きたままの動物の脳内で記憶に関連するスパインを標識し、さらには操作する手法が無かつたため、スパインと学習・記憶との関連を直接的に示す所見はなく、両者の関係は相関があるというレベルの証明だった。

そこで、学習・記憶に伴いスパインが長期増強することに着目して、長期増強スパインだけを標識・操作するために、5種類の遺伝子を組み合わせた人工遺伝子である記憶プローブを設計した(図 3.8A)。その基本骨格は、PaRac1 蛋白質という光遺伝学で使用される光感受性蛋白質である。この蛋白質は青色光を吸収すると蛋白質の立体構造が変化し、そのスパインを収縮させる性質がある(図 3.8B)。この PaRac1 を長期増強したスパインだけに集積させ、その集積を蛋白質の蛍光により“見える(可視化)”ようにしたものが記憶プローブである(図 3.8A)。実際にスパインに強い長期増強刺激を与え、そのサイズを増大させると(図 3.8C、矢頭)、記憶プローブが長期増強スパインに集積することを確認した(図 3.8C、右図、赤丸)。

次に、実際に青色光を与えることで生きたままの脳内でスパインを人為的に操作できるか確認した。大脳皮質を広範囲に光照射するための2本の光ファイバーを両側の第1次運動野表面に留置したのち(図 3.8D)、ロータロッドという運動学習課題をマウスに負荷する。光照射前に記憶プローブで標識されているスパインは、光照射後には退縮し(図 3.8D、右図、挿入拡大図2)、これとは対照的に記憶プローブで標識されないスパインは光照射で影響を受けないことが確認され(図 3.8D、右図、挿入拡大図1)、光照射は記憶プローブで標識されているスパインだけを(図 3.8D、左下図)、即ち学習・記憶により長期増強したスパインだけを収縮させることが可能になった。

では記憶・学習により長期増強したスパインだけを収縮させると如何なる行動の変化がマウスに見られるか。そのために、記憶プローブを両側の第一次運動野に遺伝子導入した群、対照実験として記憶プローブを導入しないマウス群(コントロールプローブ導入マウス)を用意し、どちらの群もロータロッド運動学習後に青色光照射を行った。光照射を行うと、コントロール群では光照射による

影響は受けなかったものの、記憶プローブを導入したマウス群は獲得した運動学習記憶が障害された。学習課題によって長期増強したスパインを特異的に退縮させると、該当記憶が障害されるということが世界ではじめて示された。これらの研究により、スパインが学習・記憶の細胞基盤を担うこと、そしてこれらのスパインの分布を検出すること、すなわち学習・記憶が貯蔵されている場所を可視化・操作する新技術が確立したことを意味する。こうして同定された、記憶スパインは脳皮質の比較的少数の細胞に密に形成されていることが分かり、特異的な記憶を担う固有の大規模な神経回路の存在が示唆された。

さらに、脳のシナプスは前部・後部ともに形態多形であり、これが記憶素子としての結合強度を決めていると考えられている。シナプス後部スパインについてはケージドグルタミン酸により我々が形態機能相関を証明しこの問題を解いた。しかし、前部については形態と機能の相関が弱く、研究上の大きな支障となってきた。我々はこの問題の解決のために SNARE の FRET プローブを開発しシナプス前終末の trans-SNARE の総量やアクティブゾーン(シナプス後部に接するシナプス前部領域、図 3.3)を標識することに成功した[T15]。

[研究実施内容5]

小林 G の新規顕微鏡を用いた脳観察:

脳の5層錐体細胞が疎らに YFP で染まっている変異動物 H-line から作った脳切片などの幾つかの標本を小林 G に渡し、新規ポンプ-プローブ顕微鏡で観察し、超解像性などを検討する共同研究を進めてきた。H27 年に至ってポンプ-プローブ型光熱顕微鏡が脳切片標本に利用でき、この H-line 標本を観察したデータを見たところ、蛍光像の無いところに光熱シグナルがあることがわ

かってきた(より詳細は小林 G の成果参照)。このデータをよく検討した結果、その存在パターンから、グリア細胞の一種アストロサイトに溜まっているグリコーゲン顆粒でないかと考えられた。実際、アストロサイトに特異的な GFAP 蛋白の抗体と共局在する顆粒も多かった。これを、完全に証明するために、グリコーゲン顆粒に対する抗体で標識する標本の作成を、東大医学部神経細胞生物学教室の岡部繁男教授と進めており、近々、標本ができる予定である。これまで、脳標本の内因性光信号としては、自家蛍光、SHG, THG, CARS などが知られてきたが、今回の光熱顕微鏡での発見は、これらに加わる新奇な信号源として新しい分野を拓いていくことになる。

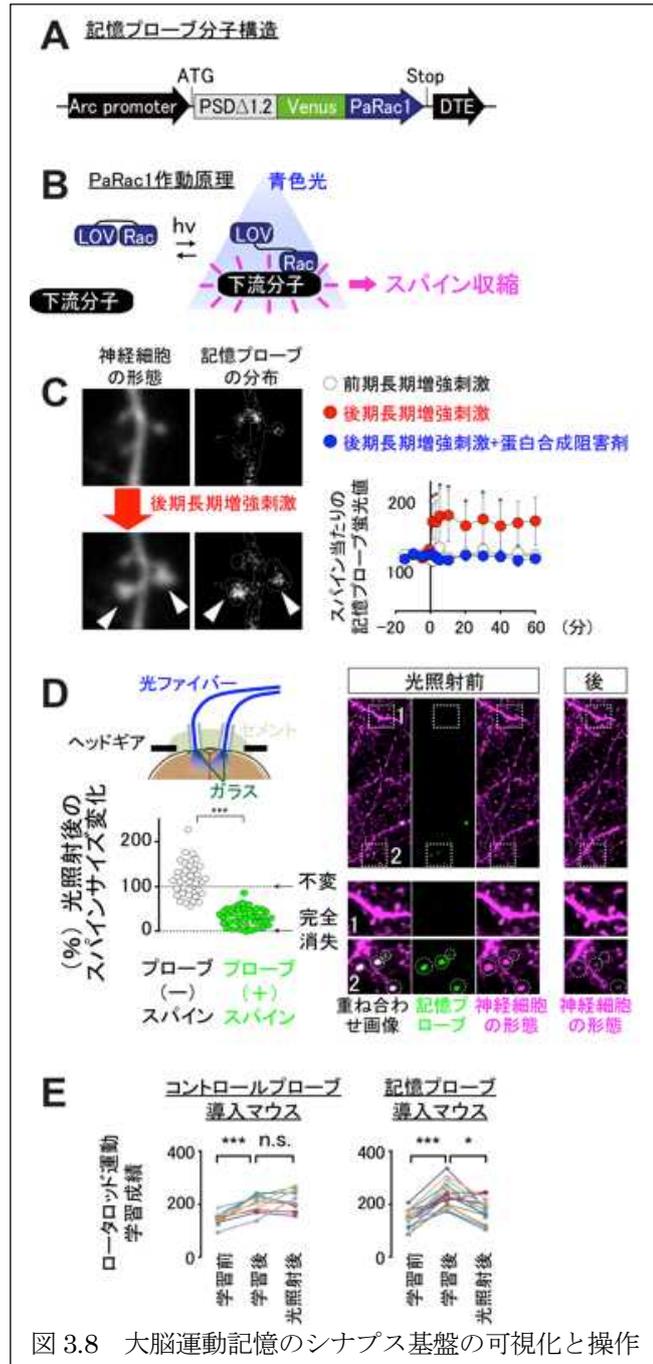


図 3.8 大脳運動記憶のシナプス基盤の可視化と操作

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 114 件)

【電通大チーム】(国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 73 件)

*は本研究課題に深い関係がある論文を意味する。

- D1. * J. Liu, K. Okamura, Y. Kida, and T. Kobayashi, "Femtosecond pulses cleaning by a transient-grating process in Kerr-optical media", *Chinese Opt. Lett.* Vol. 9, Issue 5, 051903, 2011 (DOI: 10.3788/COL201109.051903)
CREST プロジェクトの中の①多色イメージング②光刺激③光解離・紫外光劣化の3テーマのうち、①に関してその最も基本となる多色光源が、きわめて優れた空間モード特性(高い空間分解能を得るために極めて重要)、周波数スペクトル特性(多色イメージングのクロストークを最小化するために必要)、時間特性(効率良くかつ光損傷効果の少ないイメージングに重要)を有している理由を解明した。
- D2. * K. -H. Wu, H. -J. Chen, Y. -T. Chen, C. -C. Hsieh, C. -W. Luo, T. -M. Uen, J. -Y. Juang, J. -Y. Lin, T. Kobayashi, and M. Gospodinov, "Marked enhancement of Néel temperature in strained YMnO₃ thin films probed by femtosecond spectroscopy", *EPL*, Vol.94, No.2, 27006, 2011 (DOI: 10.1209/0295-5075/94/27006)
- D3. * H. Ishino, S. Iwai, S. Iwamoto, T. Okumura, T. Nishimoto, S. V. Nair, T. Kobayashi, and E. Tokunaga, "Absorption and emission spectra of molecular excitons in single perylene nanocrystals", *Phys. Rev. B*, Vol.84, Issue 4, 041303(R) (1-4), 2011 (DOI:10.1103/PhysRevB.84.041303)
- D4. T. Teramoto, J. Du, Z. Wang, J. Liu, E. Tokunaga, and T. Kobayashi, "Development of real-time vibrational spectroscopy of molecules in electronic excited states: Towards mapping molecular potential energy hypersurfaces", *J. Opt. Soc. Am. B*, Vol. 28, No. 5, pp. 1043-1050, 2011 (DOI: 10.1364/JOSAB.28.001043)
- D5. T. Kobayashi, and A. Yabushita, "Ultrafast dynamics of excited state in oxy-hemoglobin", *Chin. Opt. Lett.*, Vol. 9, No. s1, pp. s10605 (3), 2011 (DOI: 10.3788/COL201109.s10605)
- D6. J. Du and T. Kobayashi, "Real-time vibrational mode-coupling observed using a few-cycle pulse laser", *Chin. Opt. Lett.*, Vol. 9 suppl., pp. S10601 (1-3), 2011 (DOI: 10.3788/COL201109.S10601)
- D7. J. Du, K. Nakata, Y. Jiang, E. Tokunaga, and T. Kobayashi, "Spectral modulation observed in Chl-a by ultrafast laser spectroscopy (Editors' selection for inclusion in VJBO)", *Opt. Exp.*, Vol. 19, No. 23, pp. 22480-22485, 2011 (DOI: 10.1364/OE.19.022480)
- D8. Y. Kida, J. Liu, and T. Kobayashi, "Single 10-fs deep-ultraviolet pulses generated by broadband four-wave mixing and high-order dispersion compensation", *Appl. Phys. B*, Vol. 105, pp. 675 - 679, 2011 (DOI: 10.1007/s00340-011-4809-4)
- D9. J. Du, T. Teramoto, K. Nakata, E. Tokunaga, and T. Kobayashi, "Real-time vibrational dynamics in chlorophyll a studied with a few-cycle pulse laser", *Biophys. J.*, Vol. 101, No. 4, pp. 995-1003, 2011 (DOI: 10.1016/j.bpj.2011.07.011)
- D10. Y. Jiang, B. Zhao, K. Sueda, N. Miyanaga and T. Kobayashi, "Tunable sub-40 fs ultraviolet pulses from a non-collinear four-wave mixing in CaF₂ Crystal", *Chin. Opt. Lett.*, Vol. 9, No. s1, p. s10604, 2011 (DOI: 10.3788/COL201109.S10604)
- D11. T. Kobayashi, J. Liu, and Y. Kida, "Generation and optimization of femtosecond pulses by four-wave mixing process (Invited Paper)", *IEEE J. Quantum Electronics*, Selected Topics, Vol. 18, No. 1, pp. 54-65, 2012 (DOI: 10.1109/JSTQE.2011.2105256)

- D12. * T. Kobayashi and Y. Kida, “Ultrafast spectroscopy with sub-10-fs deep-ultraviolet pulses”, *Phys. Chem. Chem. Phys. (Advance Article)*, Vol.14, pp.6200-6210, published on web February 2012 (DOI: 10.1039/C2CP23649D)
 [D12]: 世界初の分光に使用可能な深紫外サブ 10 fs パルスを開発した。それを用いたサブ 10 fs・128 チャンネル分光によるチミンの励起状態のダイナミクスを明らかにした。これまでの深紫外パルスを用いた研究は、分解能 100 fs、1 チャンネル測定のみであった。これにより、104 倍もの精度の実験が、100 分の 1 の時間で出来る様になった。
- D13. * S. Yukita, N. Shiokawa, H. Kanemaru, H. Namiki, T. Kobayashi and E. Tokunaga, “Deflection switching of a laser beam by the Pockels effect of water”, *Appl. Phys. Lett.* Vol.100, No.17, pp.171108-1~3, 2012 (DOI: 10.1063/1.4705154)
- D14. * J. Harra, J. Mäkitalo, R. Siikanen, M. Virkki, G. Genty, T. Kobayashi, M. Kauranen, and J.M. Mäkelä, “Size-controlled aerosol synthesis of silver nanoparticles for plasmonic materials”, *Nanoparticle Res.*, Vol.14, No.6, pp. 870, 2012 (DOI: 10.1007/s11051-012-0870-0)
- D15. C.W. Luo, I. H. Wu, P. C. Cheng, J.-Y. Lin, K. H. Wu, T. M. Uen, J.Y. Juang, T. Kobayashi, D. A. Chareev, O. S. Volkova, and A. N. Vasiliev, “Quasiparticle dynamics and phonon softening in FeSe superconductors”, *Phys. Rev. Lett.*, Vol.108, Issue 25, pp.257006, 2012 (DOI: 10.1103/PhysRevLett.108.257006)
- D16. I. Iwakura, A. Yabushita, J. Liu, K. Okamura, and T. Kobayashi, “Photo-impulsive reactions in the electronic ground state without electronic excitation: non-photo, non-thermal chemical reactions”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Vol.21, Issue14, pp.9696-9701, 2012 (DOI: 10.1039/C2CP40607A)
- D17. * S.-C. Chen, Y.-K. Liao, H.-J. Chen, C.-H. C., C.-H. Lai, Y.-L. C., H.-C. Kuo, K.-H. Wu, J.-Y. Juang, S.-J. Cheng, T.-Po H., and T. Kobayashi, “Ultrafast carrier dynamics in Cu(InGa)Se₂ thin films probed by femtosecond pump-probe spectroscopy”, *Opt. Exp.*, Vol. 20, Issue 12, pp. 12675-12681, 2012 (<http://dx.doi.org/10.1364/OE.20.012675>)
- D18. * L. Y. Chen, J. C. Yang, C. W. Luo, C. W. Laing, K. H. Wu, J.-Y. Lin, T. M. Uen, J. Y. Juang, Y. H. Chu, and T. Kobayashi, “Ultrafast photoinduced mechanical strain in epitaxial BiFeO₃ thin films”, *Appl. Phys. Lett.*, Vol.101, Issue4, pp.41902, 2012 (<http://dx.doi.org/10.1063/1.4734512>)
- D19. * H. I. Wang, W. T. Tang, P. S. Tseng, L.W. Liao, C. W. Luo, C.-S. Yang and T. Kobayashi, "Femtosecond laser-induced formation of wurtzite phase ZnSe nanoparticles in air", *J. of Nanomat.*, Vol.2012, ID278364, 2012 (DOI:10.1155/2012/278364)
- D20. Y. Kida, K. Okamura, J. Liu and T. Kobayashi, “Sub-10-fs deep-ultraviolet light source with stable power and spectrum”, *Appl. Opt.*, Vol. 51, Issue 26, pp.6403-6410, 2012 (<http://dx.doi.org/10.1364/AO.51.006403>)
- D21. *H.-J. Chen, K. -H. Wu, C. -W. Luo, T. -M. Uen, J. -Y. Juang, J.-Y. Lin, T. Kobayashi, H. D. Yang, R. Shankar, F. C. Chou, H. Berger, and J. -M. Liu, “Phonon dynamics in Cu_xBi₂Se₃ (x=0, 0.1, 0.125) and Bi₂Se₂ crystals studied using femtosecond spectroscopy”, *Appl. Phys. Lett.*, Vol. 101, Issue12, 121912, 2012 (DOI: 10.1063/1.4754005)
- D22. *C. W. Luo, W. T. Tang, H. I. Wang, L. W. Liao, H. P. Lo, K. H. Wu, J.-Y. Lin, J. Y. Juang, T. M. Uen, and T. Kobayashi, "Controllable subwavelength-ripple and -dot structures on YBa₂Cu₃O₇ induced by ultrashort laser pulses", *Supercond. Sci. Technol.* Vol.25, No.11, pp.115008, 2012 (DOI:10.1088/0953-2048/25/11/115008)
- D23. *C. W. Luo, I. H. Wu, P. C. Cheng, J.Y. Lin, K. H. Wu, T. M. Uen, J. Y. Juang, T. Kobayashi, Y. C. Wen, T. W. Huang, K. W. Yeh, M. K. Wu, D. A. Chareev, O. S.

- Volkova and A. N. Vasiliev, "Ultrafast dynamics and phonon softening in $\text{Fe}_{1+y}\text{Se}_{1-x}\text{Te}_x$ single crystals", *New J. Phys.*, Vol.14, pp.103053, 2012 (DOI:10.1088/1367-2630/14/10/103053)
- D24. J. Liu, F. J. Li, Y. L. Jiang, C. Li, Y. X. Leng, T. Kobayashi, R. X. Li, and Z. Z. Xu, "Transient-grating self-referenced spectral interferometry for infrared femtosecond pulse characterization", *Opt. Lett.*, Vol.37, No.23, pp.4829-4831, 2012 (DOI: 10.1364/OL.37.004829)
- D25. *S. - C. Chen, K. - Y. Sung, W. -Y. Tzeng, K. -H. Wu, J. -Y. Juang, T. -M. Uen, C. -W. Luo, J.-Y Lin, T. Kobayashi, and H. C. Kuo, "Microstructure and magnetic properties of oxidized titanium nitride thin films in situ grown by pulsed laser deposition", *J. Physics D: Applied Physics*, Vol. 46, No.7, 075002, January 2013 (DOI:10.1088/0022-3727/46/7/075002)
- D26. J. He, J. Du and T. Kobayashi, "Low-threshold and compact multicolored femtosecond laser generated by using cascaded four-wave mixing in a diamond plate", *Opt. Commun.*, Vol.290, pp.132-135, 2013 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.optcom.2012.10.025>)
- D27. I. Iwakura, Y. Kaneko, S. Hayashi, A. Yabushita, and T. Kobayashi, "The Reaction mechanism of Claisen rearrangement obtained by transition state spectroscopy and single Direct-Dynamics Trajectory", *Molecules*, Vol.18, pp.1995-2004, 2013 (DOI: 10.3390/molecules18021995)
- D28. *T. Kobayashi, "Development of ultrafast spectroscopy and reaction mechanisms studied by the observation of ultrashort-life species and transition states", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, Vol. 86 , No.2, pp. 167–182, 2013(Award Accounts) (DOI: 10.1246/bcsj.20120250)
Chemical Society of Japan Award
- D29. *T. Kobayashi, T. Iiyama, K. Okamura, J. Du, and T. Masuda, "Ultrafast electronic relaxation and vibrational dynamics in a polyacetylene derivative" , *Chem. Phys. Lett.*, Vol.567, pp. 6-13, 2013 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2013.02.068>)
- D30. *J. Liu, A. Yabushita, S. Taniguchi, H. Chosrowjan, Y. Imamoto, , K. Sueda, N. Miyanaga, T. Kobayashi, "Ultrafast time-resolved pump-probe spectroscopy of PYP by a sub-8fs pulse laser at 400 nm", *J. Phys. Chem. B*, Vol. 117, Issue 17, pp 4818–4826, 2013 (DOI: 10.1021/jp4001016)
- D31. *C.-W. Luo, I-H. Wu, P-C. Cheng, J.-Y Lin, K. -H. Wu, T. -M. Uen, J. -Y. Juang, T. Kobayashi, D. -A. Chareev, O. -S. Volkova, and A.- N. Vasiliev, "Quasiparticle dynamics in FeSe superconductors studied by femtosecond spectroscopy", *J. Supercond. Nov. Magn.*, Vol. 26, Issue 4, pp.1213–1215, 2013 (DOI 10.1007/s10948-012-1929-y)
- D32. T. Kobayashi, M.Yamashita, J. Du, J .Zhang, I.Iwakura, "Vibrational and electronic relaxation in MEH-PPV using few cycle pulses", *Chem. Phys. Lett.* Vol.579, pp.51-57, 2013 (DOI: 10.1016/j.cplett.2013.06.029)
- D33. T. Kobayashi, Z. Nie, J.Du, K.Okamura, H.Kataura, Y.Sakakibara, Y.Miyata, "Electronic relaxation and coherent phonon dynamics in semiconducting single-walled carbon nanotubes with several chiralities", *Phys. Rev. B*, Vol.88, No.3, pp.35424-35439, 2013 (DOI: 10.1103/PhysRevB.88.035424)
- D34. *S. -A. Ku, C. -M. Tu, W.-C. Chu, C. -W. Luo, K. -H. Wu, A. Yabushita, C. -C. Chi, and T. Kobayashi, "Saturation of the free carrier absorption in ZnTe crystals", *Opt. Exp.*, Vol.21, No.12, pp. 13930-13937, 2013 (DOI:10.1364/OE.21.013930)
- D35. *J.-P. He, T. Kobayashi, "Generation of sub-20-fs deep-ultraviolet pulses by using chirped-pulse four-wave mixing in CaF_2 plate", *Opt. Lett.*, Vol.38, No.16, pp. 2938-2940, 2013 (<http://dx.doi.org/10.1364/OL.38.002938>)
- D36. *K. Seto, Y. Okuda, E. Tokunaga, and T. Kobayashi, "Development of a multiplex

- stimulated Raman microscope for spectral imaging through multi-channel lock-in detection”, *Rev. Sci. Instrum.*, Vol. 84, No.8, 83705, 2013 (DOI: 10.1063/1.4818670)
- [D36]: フォトニック結晶ファイバーにより発生した白色プローブ光とチタンサファイアレーザーによる誘導ラマン効果をマルチチャンネルロックイン増幅器により同時広帯域高感度検出する事に成功した。
- D37. I. Iwakura A. Yabushita, J. Liu, K. Okamura, S. Kezuka, and T.Kobayashi, “A new reaction mechanism of Claisen rearrangement induced by few-optical-cycle pulses: Demonstration of nonthermal chemistry by femtosecond vibrational spectroscopy”, *Pure Appl. Chem.*, ASAP Article, 2013 (<http://dx.doi.org/10.1351/PAC-CON-12-12-01>)
- D38. *C. W. Luo, H.-J. Chen, C. M. Tu, C. C. Lee, S. A. Ku, W. Y. Tzeng, T. T. Yeh, M. C. Chiang, H. J. Wang, W. C. Chu, J.-Y. Lin, K. H. Wu, J. Y. Juang, T. Kobayashi, C.-M. Cheng, C.-H. Chen, K.-D. Tsuei, H. Berger, R. Sankar, F. C. Chou, H. D. Yang , “THz Generation and detection on Dirac Fermions in topological insulators”, *Adv. Opt. Mater.*, published online: July 30, 2013 (DOI: 10.1002/adom.201300221)
- D39. K. Nakagawa, Y.Numata, H. Ishino, D.Tanaka, T. Kobayashi and E.Tokunaga, “Excimer luminescence from nonresonantly excited pyrene and perylene molecules in solution”, *J. Phys. Chem. A*, Vol.117, Issue.45, pp.11449–11455, 2013 (DOI: 10.1021/jp402330n)
- D40. D.Hasegawa, K.Nakata, E. Tokunaga, K.Okamura, J. Du, T. Kobayashi Vibrational energy flow between modes by dynamic mode coupling in THIATS J-Aggregates, *J. Phys.Chem.*, Vol.117, Issue.45, pp.11441-11448, 2013 (DOI: 10.1021/jp4015228)
- D41. C.W. Luo, H. J. Wang, S. A. Ku, H.-J. Chen, T. T. Yeh, J.-Y. Lin, K.-H. Wu, J.-Y. Juang, B. L. Young, T. Kobayashi, C.-M. Cheng, C.-H. Chen, K.-D. Tsuei , R. Sankar , F. Chou , K. Kokh , O. E. Tereshchenko , E. V. Chulkov , Yu. M. Andreev, and Genda Gu, "Snapshots of Dirac fermions near the Dirac point in topological insulators", *Nano Lett.*, Vol.13, 12, pp 5797–5802, Nov. 2013 (DOI: 10.1021/nl4021842)
- D42. T. Kobayashi, Nie Zhaogang, Juan Du, "Coherent phonon coupled with exciton in semiconducting single-walled carbon nanotubes using a few-cycle pulse laser", *J.Lumin*, Vol.152, 11-14, 2013 (DOI: 10.1016/j.jlumin.2013.12.025)
- D43. Takayoshi Kobayashi, Zhaogang Nie, Bing Xue, H.Kataura, Y.Sakakibara, Y. Miyata, "Real-time spectroscopy of single-walled carbon nanotubes for negative time delays by using a few-cycle pulse laser”, *J.Phys.Chem.C*, Vol. 118, Issue.6, pp.3285–3294, Publication Date (Web): January 16, 2014 (DOI: 10.1021/jp409202z)
- D44. *K. Seto, T. Tsukada, Y. Okuda, E. Tokunaga, and T. Kobayashi, "Development of a balanced detector with biased synchronous detection and application to noise cancelling of supercontinuum pulse light", *Rev. Sci. Instrum.*, 85, 2, 023702, 2014 (DOI: 10.1063/1.4863879): 特許に申請済みの時分割雑音各波長に適用することにより、高速な同時多色イメージングが可能となる。
- D45. A. Yabushita, D.-Y. Juang, C.-H. Kao, A. Baltuška, and T. Kobayashi, “Generation of multi-color carrier-envelope phase locked pulse with continuous color tenability”, *Opt. Comm.* 315, 310–316, March 2014 (DOI: 10.1016/j.optcom.2013.11.026)
- D46. *J. Miyazaki, H. Tsurui, A. Hayashi-Takagi, H. Kasai, and T. Kobayashi, “Sub-diffraction resolution pump-probe microscopy with shot-noise limited

- sensitivity using laser diodes”, *Opt. Exp.*, 22, 8, 9024-9032, 2014 (DOI: 10.1364/OE.22.009024)
- *Selected by the Editors, Andrew Dunn and Anthony Durkin, for publication in the most recent issue of the Virtual Journal for Biomedical Optics (VJBO), a special feature of OSA's Optics InfoBase (http://vjbo.osa.org/virtual_issue.cfm)
- D47. Y. Numata, S. V. Nair, K. Nakagawa, H. Ishino, T. Kobayashi, and E. Tokunaga, “Optical size effect of organic nanocrystals studied by absorption spectroscopy within an integrating sphere”, *Chem. Phys. Lett.* 601, 128-133, 2014 (DOI: 10.1016/j.cplett.2014.03.077)
- D48. *J.-P. He and T. Kobayashi, “18.7-fs DUV pulses generated by using chirped-pulse four-wave mixing in Bulk material”, Conference Paper, CLEO: QELS_ Fundamental Science, San Jose, California U.S., June 8-13, 2014 ISBN: 978-1-55752-999-2
- D49. *J. Miyazaki, K. Kawasumi, and T. Kobayashi, “Resolution improvement in laser diode-cased pump-probe microscopy with an annular pupil filter”, *Opt. Lett.* 39, 14, 4219-4222, 2014 (DOI: 10.1364/OL.39.004219)
- D50. *J. Miyazaki, H. Tsurui, K. Kawasumi, and T. Kobayashi, “Optimal detection angle in sub-diffraction resolution photothermal microscopy: application for high sensitivity imaging of biological tissues” *Opt. Exp.* 22, 16, 18833-18842, 2014 (DOI:10.1364/OE.22.018833)
- D51. *K. Seto, Y. Okuda, E. Tokunaga, and T. Kobayashi, “Multiplex stimulated Raman imaging with white probe-light from a photonic-crystal fiber and with multi-wavelength balanced detection”, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 47, 34, 345401, 2014 (DOI: 10.1088/0022-3727/47/34/345401)
- D52. (=H22)*S. Boinapally, B. Huang, M. Abe, C. Katan, J. Noguchi, S. Watanabe, H. Kasai, B. Xue, and T. Kobayashi, “Caged glutamates with π -extended 1,2-dihydronaphthalene chromophore: design, synthesis, two-photon absorption property, and photochemical reactivity”, *J. Org. Chem.* 79, 17, 7822–7830, 2014 (DOI: 10.1021/jo501425p)
- D53. K. Nakata, E. Tokunaga, J. Du, B. Xue, J. Miyazaki, K. Seto, and T. Kobayashi, “Sub-10 fs spectroscopy of K-TCNQ crystal for observation of intramolecular vibration modulation in melting of the Peierls dimer”, *Phys. Rev. B*, 90, 85119, 2014 (DOI: 10.1103/PhysRevB.90.085119)
- D54. *J.-P. He, N. Wang, and T. Kobayashi, "Generation of stable two-color laser pulses in photonic crystal fiber for microscopy", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 53, 9, 92704, 2014 (DOI: 10.7567/JJAP.53.092704)
- D55. *J.-P. He, J. Liu, and T. Kobayashi, "Tunable multicolored femtosecond laser pulses generation by using cascaded four-wave mixing in bulk materials", *Appl. Sci.*, 4, 3, 444-467, 2014 (DOI: 10.3390/app4030444)
- D56. *J. Miyazaki, K. Kawasumi and T. Kobayashi, “Frequency domain approach for time-resolved pump-probe microscopy using intensity modulated laser diodes”, *Rev. Sci. Instrum.*, 85, 9, 093703, 2014 (DOI: 10.1063/1.4895832) 被引用数: 1
- D57. *N. Wang and T. Kobayashi, “Numerical study of the subtraction threshold for fluorescence difference microscopy”, *Opt. Exp.* 22, 23, 28819–28830, 2014 (DOI: 10.1364/OE.22.028819)
- D58. *N. Wang, J. Miyazaki, J. He, K. Seto, and T. Kobayashi, “Sub-diffraction-limit Imaging using mode multiplexing”, *Opt. Commun.*, 343, 28-33, 2015 (DOI: 10.1016/j.optcom.2014.12.072)
- D59. *Y.-T. Wang, C.-W. Luo, A. Yabushita, K.-H. Wu, T. Kobayashi, C.-H. Chen and L.-J. Li, “Ultrafast multi-level logic gates with spin-valley coupled polarization anisotropy in monolayer MoS₂”, *Sci. Rep.*, 5, 8289, 2015

(DOI: 10.1038/srep08289)

- D60. *J. Miyazaki, H. Tsurui, K. Kawasumi, and T. Kobayashi, "Sensitivity enhancement of photothermal microscopy with radially segmented balanced detection", *Opt Lett.* 40, 4, 479-482, 2015 (DOI: 10.1364/OL.40.000479)
- D61. *J. Miyazaki, H. Tsurui, K. Kawasumi, and T. Kobayashi, "Simultaneous dual-color imaging of nonfluorescent tissues with 3D subdiffraction photothermal microscopy", *Opt. Exp.* 23, 3, 3647-3656, 2015 (DOI: 10.1364/OE.23.003647)
- D62. *Y.-T Wang, M.-H.Chen, C.-T. Lin, J.-J. Fang, C.-J. Chang, C.-W. Luo, A. Yabushita, K.-H. Wu, and T. Kobayashi, "Use of ultrafast time-resolved spectroscopy to demonstrate the effect of annealing on the performance of P3HT:PCBM solar cells", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7, 8, 4457-4462, 2015 (DOI: 10.1021/am508091u)
- D63. *J.-P. He, J. Miyazaki, N. Wang, H. Tsurui, and T. Kobayashi, "Label-free imaging of melanoma with nonlinear photothermal microscopy", *Opt. Lett.* 40, 7, 1141-1144, 2015 (DOI: 10.1364/OL.40.001141)
*OSA Spotlight, March 2015
- D64. *J.-P. He, J. Miyazaki, N.Wang, H. Tsurui, and T. Kobayashi, "Biological imaging with nonlinear photothermal microscopy using a compact supercontinuum fiber laser source", *Opt. Exp.* 23, 8, 9762-9771, Apr 2015 (DOI:10.1364/OE.23.009762)
- D65. *K. Seto, T. Tsukada, Y. Okuda, E. Tokunaga, and T. Kobayashi, "Noise cancellation with phase-detection technique for pump-probe measurement and application to stimulated Raman imaging", *J.Opt. Soc. Amer. A*, 32, 5, 809-821, April 21, 2015 (DOI: 10.1364/JOSAA.32.000809)
- D66. *N. Wang and T. Kobayashi, "Numerical calibration of the spatial overlap for subtraction Microscopy", *Opt. Exp.* 23, 10, 13410-13422, 18 May 2015 (DOI: 10.1364/OE.23.013410)
- D67. *N. Wang and T. Kobayashi, "Polarization modulation for fluorescence emission difference microscopy", *Opt. Exp.* 23, 10, 13704-13712, 18 May 2015 (DOI:10.1364/OE.23.013704)
- D68. H.-P. Lo, A. Yabushita, and T. Kobayashi, "Photon doughnut-shaped pair for easy production of entangled photon pairs", *Phys. Rev. A*, 91, 6, 62327, 29-Jun-2015 (DOI: 10.1103/PhysRevA.91.062327)
- D69. *A. Yabushita, C.-H. Kao, Y.-H. Lee, and T. Kobayashi, "Development and demonstration of table-top synchronized fast-scan femtosecond time-resolved spectroscopy system by single-shot scan photo detector array", *Jpn. J. Appl. Phys.* 54, 7, 072401, published online June 22, 2015 (DOI:10.7567/JJAP.54.072401)
- D70. J. Du, Z.Li, B. Xue, T.Kobayashi, D. Han, Y. Zhao, and Y. Leng, "Ultrafast pre-breakdown dynamics in Al₂O₃/SiO₂ reflector by femtosecond UV laser spectroscopy", *Opt. Exp.* 23, 13, 17653-17658, published 26 Jun 2015 (DOI: 10.1364/OE.23.017653)
- D71. T. Zeng, J.-P. He, T. Kobayashi, and W. Liu, "Mechanism study of 2-D laser array generation in a YAG crystal plate", *Opt. Exp.* 23, 15, 19092-19097, Jul 2015 (DOI: 10.1364/OE.23.019092)
- D72. *J. Miyazaki, H. Tsurui, and T. Kobayashi, "Reduction of distortion in photothermal microscopy and its application to the high-resolution three-dimensional imaging of nonfluorescent tissues", *Biomed.Opt.Exp.* 6, 9, 3217-3224, published 4 Aug 2015 (DOI: 10.1364/BOE.6.003217)
- D73. *C.-W. Luo, Y.-T. Wang, A. Yabushita, T. Kobayashi, "Ultra-broadband time-resolved spectroscopy in novel condensed matters", *Optica* 3, 1, 82-92 (2016)
- D74. D74. D. Han, J. Du, T. Kobayashi, T. Miyatake, H. Tamiaki, Y. Li, and Y. Leng, "Excitonic relaxation and coherent vibrational dynamics in Zinc Chlorin aggregates for artificial photosynthetic systems" *J. Phys. Chem. B*, Article ASAP, 119, 37, 12265-12273, (Web): August 25, 2015 (DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b06214)

- D75. C.-M. Tu, T.-T. Yeh, W.-Y. Trng, Y.-R. Chen, H.-J. Chen, S.-A. Ku, C.-W. Luo, J.-Y. Lin, K.-H. We, J.-Y. Juang, T. Kobayashi, C.-M. Cheng, K.-D. Tsuei, H. Berger, R. Sankar, and F.-C. Chou, "Manifestation of a second dirac surface state and bulk bands in THz radiation from Topological insulators" *Scientific Report* 5, 14128-1 - 14128-8, September 15, 2015 (DOI: 10.1038/srep14128)
- D76. *N. Wang and T. Kobayashi, "Subtraction threshold for an isotropic fluorescence emission difference microscope" *Journal of Optics* 17, 125302, Oct-15, 2015 (DOI: 10.1088/2040-8978/17/12/125302)
- D77. *T. Kobayashi, A. Jarota, and B. Xue, "Application of ultrashort DUV pulse laser to study the primary dynamic process of molecules in vitamin D biosynthesis" *The review of Laser Engineering*, 43, 10, 703-706, 2015
- D78. S. Dong, D. Trivedi, S.Chakraborty, T. Kobayashi, Y. Chan, O. V. Prezhdo, and Z.-H. Loh, "Observation of an excitonic quantum coherence in CdSe nanocrystals" *Nano Lett.* 15, 10, 6875-6882, 11-Sep, 2015 (DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b02786)
- D79. N. Komori, R. Motoishi, S. Jakkampudi, M. Abe, K. Kamada, K. Furukawa, C. Katan, W. Sawada, N. Takahashi, H. Kasai, B. Xue, and T. Kobayashi, "Design and synthesis of a new chromophore, 2-(4-nitrophenyl) benzofuran, for two-photon uncaging using near-IR light" *Chem.Comm.* 52, 331-334, 21 October, 2015 (DOI: 10.1039/c5cc07664a)
- D80. B. Xue, C. Katan, J. A. Bjorgaard, and T. Kobayashi, "Non-degenerate two photon absorption enhancement for laser dyes by precise lock-in detection" *AIP Advances* 5, 127138, 1-5, Dec. 31, 2015 (<http://dx.doi.org/10.1063/1.4939568>)
- D81. C.-W. Luo, Y.-T. Wang, A. Yabushita, T. Kobayashi, "Ultra-broadband time-resolved spectroscopy in novel types of condensed matter" *Optica* 3, 1, 82-92, Jan. 14, 2016 (DOI: 10.1364/OPTICA.3.000082)
- D82. T. Kobayashi, "Ultrafast spectroscopy of coherent phonon in carbon nanotubes using sub-5-fs visible pulses" *AIP Conf. Proc.* 1709, 20001, 1 Feb. 2016 (DOI: 10.1063/1.4941200)
- D83. C.-M. Tu, L.-H. Chou, Y.-C. Chen, P. Huang, M. Rajaboopathi, C.-W. Luo, K.-H. Wu, V. Krishnakumar, and T. Kobayashi, "THz emission from organic cocrystalline salt: 2, 6-diaminopyridinium-4-nitrophenolate-4- nitrophenol" *Opt.Exp.* 24, 5, 5039-5044, 29-Feb, 2016 (DOI: 10.1364/OE.24.005039)
- D84. H.-P. Lo, C.-M. Li, A. Yabushita, Y.-N. Chen, C.-W. Luo, T. Kobayashi "Experimental violation of Bell inequalities for multidimensional systems" *Scientific Reports* 6, 22088, Feb. 26, 2016 (DOI: 10.1038/srep22088)
- D85. M. Suzuki, K. Nakata, R. Kuroda, T. Kobayashi, E. Tokunaga "Electrooptic Kerr effect of porphyrin H-aggregates in polymer films: polymer specific spectral blue shift" *Chem. Phys.* 469-470, 88-96, Available online 17 February, 2016 (DOI: 10.1016/j.chemphys.2016.02.002)
- D86. *J. Miyazaki, T. Iida, S. Tanaka, A. Hayashi-Takagi, H. Kasai, S. Okabe and T. Kobayashi, "Fast 3D visualization of endogenous brain signals with high-sensitivity laser scanning photothermal microscopy" *Biomed. Opt.Express* 7, 5, 1702-1710, 2016 (DOI: 10.1364/BOE.7.001702)
- D87. D. Tanaka, Y. Numata, K. Nakagawa and T. Kobayashi "Cross-shaped photo luminescence of excimers in perylene crystals" *Optical Review*, 22, 2016 (DOI: OPRE-D-16-00011)

【広島大チーム】(国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 26件)

- H1.* J. Arimura, T. Mizuta, Y. Hiraga, M. Abe*, Formation of Macrocyclic Lactones in the Paterno-Buchi Dimerization Reaction. *Beilstein Journal of organic Chemistry*, 2011, 7, 265-269. (DOI: 10.3762/bjoc.7.35)

- H2.* Y. Yabuno, Y. Hiraga, R. Takagi, M. Abe,* Concentration and Temperature Dependency of Regio- and Stereoselectivity in a Photochemical [2+2] Cycloaddition Reaction (the Paterno-Buchi Reaction): Origin of the Hydroxy-group Directivity, *Journal of the American Chemical Society*, **2011**, *133*, 2592-2604. (DOI: 10.1021/ja1088524)
- H3. M. Abe, I. Iwakura, A. Yabushita, S. Yagi, J. Liu, K. Okamura, T. Kobayashi, Direct Observation of Denitrogenation Process of 2,3-Diazabicyclo[2.2.1]hept-2-ene (DBH) Derivatives, Using a Visible 5-fs pulse laser, *Chem. Phys. Lett.*, vol. 527, pp. 79-83, 2012 (DOI: 10.1016/j.cplett.2012.01.024)
- H4. S. Yagi, Y. Hiraga, R. Takagi, and M. Abe, Stereochemical Deuterium Labeling Study on the Denitrogenation of 7,7-Diethoxy-2,3-diazabicyclo[2.2.1]hept-2-ene, *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 24, 894-901, 2011 (DOI: 10.1002/poc.1872)
- H5.* K. Hisamoto, Y. Hiraga, and M. Abe, Hydroxy-group effect on the regioselectivity in a photochemical oxetane formation reaction (the Paterno-Buchi Reaction) of geraniol derivatives, *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 10, pp. 1469-1473, 2011 (DOI: 10.1039/c1pp05056g)
- H6. Y. Hiraga, T. Widiandi, T. Kunishi, and M. Abe, The cooperative effect of a hydroxyl and carboxyl group on the catalytic ability of novel beta-homoproline derivatives on direct asymmetric aldol reactions, *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 22, No. 2, pp. 226-237, 2011 (DOI:10.1016/j.tetasy.2011.01.025)
- H7. M. Abe, S. Watanabe, H. Tamura, S. Boinapally, K. Kanahara, Y. Fujiwara, Substituent Effect on Reactivity of Triplet Excited State of 2,3-Diazabicyclo[2.2.1]hept-2-enes, DBH Derivatives: CN Bond Cleavage versus CC Bond Cleavage. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1940-1948. (DOI: 10.1021/jo3019472)
- H8. R. Takagi, K. Yamamoto, Y. Hiraga, S. Kojima, M. Abe, A novel non-metathetic behavior of Grubbs catalyst: Ruthenium-mediated intramolecular [3 + 2] cycloaddition of bis-1,3-dienes. *J. Organometallic Chem.*, **2013**, *723*, 171-175. (DOI: 10.1016/j.jorganchem.2012.09.004)
- H9. M. Abe, H. Furunaga, D. Ma, L. Gagliardi, G. Bodwell, Stretch Effects Induced by Molecular Strain on Weakening σ -Bonds: Molecular Design of Long-Lived Diradicals (Biradicals). *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7612-7619. (DOI: 10.1021/jo3016105)
- H10. M. Abe, J. Ye, M. Mishima, The Chemistry of Localized Singlet 1,3-Diradicals (Biradicals): from Putative Intermediates to Persistent Species and Unusual Molecules with a π -Singlet Bonded Character, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 3808-3820. (DOI: 10.1039/c2cs00005a.)
- H11. J. Ye, Y. Fujiwara, M. Abe, Substituent Effect on the Energy Barrier for σ -Bond Formation from π -Single Bonded Species, Singlet 2,2-Dialkoxy-cyclopentane-1,3-diyls. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 925-933. (DOI:10.3762/bjoc.9.106)
- H12. A. Riahi, J. Muzart, M. Abe and N. Hoffmann, On the decarboxylation of 2-methyl-1-tetralone-2-carboxylic acid – oxidation of the enol intermediate by triplet oxygen. A. Riahi, J. Muzart, M. Abe and N. Hoffmann, *New J. Chem.* **2013**, *37*(8), 2245-2249. (DOI:10.1039/C3NJ00457K)
- H13. T. Nakagaki, T. Sakai, T. Mizuta, Y. Fujiwara, M. Abe, Kinetic Stabilization and Reactivity of π -Single Bonded Species: Alkoxy Group Effect on the Lifetime of Singlet 2, 2-Dialkoxy-1,3-diphenyloctahydropentalene-1,3-diyls. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*(31), 10395-10404. (DOI: 10.1002/chem.201300038)
- H14.* Y. Sakamoto, S. Boinapally, C. Katan, M. Abe, Synthesis and photochemical reactivity of caged glutamates with a π -extended coumarin chromophore as a photolabile protecting group. *Tetrahedron Lett.*, **2013**, *54*(52), 7171-7174. (DOI:10.1016/j.tetlet.2013.10.107)
- H15. K. Komeyama,* Y. Nagao, M. Abe, K. Takaki, Scope and Limitation for

- FeSO₄-Mediated Direct Arylation of Heteroarenes with Arylboronic Acids and Its Synthetic Applications, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2014**, *87* (2), 301-313. (DOI:10.1246/bcsj.20130166)
- H16. R. Takagi, K. Tanaka, K. Yamamoto, Y. Hiraga, S. Kojima, M. Abe, Formation of isomerized E, Z-configured 1, 3-dienes in construction of macrocyclic trienes by diene-ene RCM, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 2015, *88*(1), 146-148, DOI:10.1246/bcsj.20140250
- H17. S. Sugawara, M. Abe, Y. Fujiwara, M. Wakioka, F. Ozawa, Y. Yamamoto, 1,8-Disubstituted Xanthylidene-Based Remote Carbenes: Photolytic Generation and Isolation of Low-Coordinate Palladium(II) Complex, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2015, 2015(3), 534-541, DOI:10.1002/ejic.201403017
- H18. S. Fuku-en, K. Furukawa, T. Sasamori, N. Tokitoh, M. Abe, Y. Yamamoto, Oxidation of an allene compound bearing 1,8-dichloroacridene moieties and photolysis of the halogenated allene compound for the generation of triplet carbenes, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2015, *28*, 79-87. DOI:10.1002/poc.3398
- H19. A. A. Upul Ranaweera, Ranaweera; G. K. Weragoda, J. Bain, S. Watanabe, M. Abe, A. D. Gudmundsdottir, Photolysis of acetophenone derivatives with α -cyclopropyl substituents, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2015, *28*, 137-146, DOI:10.1002/poc.3389
- H20. Y. Omokawa, S. Hatano, M. Abe, Electron-spin resonance (ESR) characterization of quintet spin-state bis-nitroxide-bearing cyclopentane-1,3-diyl diradicals. Omokawa, Y.; Hatano, S.; Abe, M. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2015, *28*, 116-120, DOI:10.1002/poc.3381
- H21. R. Kishi, Y. Murata, M. Saito, K. Morita, M. Abe, M. Nakano, Theoretical Study on Diradical Characters and Nonlinear Optical Properties of 1,3-Diradical Compounds, *Journal of Physical Chemistry A*, 2014, *118*(45), 10837-10848, DOI:10.1021/jp508657s
- H22.* (=D52)S. Boinapally, B. Huang, M. Abe, C. Katan, M. Noguchi, S. Watanabe, H. Kasai, B. Xue, T. Kobayashi, Caged Glutamates with π -Extended 1,2-Dihydronaphthalene Chromophore: Design, Synthesis, Two-Photon Absorption Property, and Photochemical Reactivity, *J. Org. Chem.*, 2014, *79*, 7822-7830. As a Featured Article. DOI: 10.1021/jo501425pl.
- H23. A. Maeda, T. Oshita, M. Abe, T. Ishibashi, Time-Resolved IR Spectroscopy of 1,3-Dicyanophenylcyclopentane-1,3-diyl Diradicals: CN Stretching Wavenumber as a Vibrational Signature of Radical Character, *J. Phys. Chem. B*, 2014, *118*, 3991-3997. dx.doi.org/10.1021/jp500636ji
- H24. S. Sarkar, A. Sawai, K. Kanahara, C. Wentrup, M. Abe, A. D. Gudmundsdottir, Direct Detection of a Triplet Vinylnitrene, 1,4-Naphthoquinone-2-yl nitrene in Solution and Cryogenic Matrices, Sarkar, Sujan; Sawai, Asako; Kanahara, Kousei; Wentrup, Curt; Abe, Manabu; Gudmundsdottir, Anna*, *Journal of the American Chemical Society*, **2015**, *137*, 4207-4214. DOI: 10.1021/jacs.5b00998
- H25. S. Konda, Q.-S., Guo, M. Abe, H. Huang, H. Arman, J. Zhao, Organocatalyzed Asymmetric Aldol Reactions of Ketones and β,γ -Unsaturated α -Ketoesters and Phenylglyoxal Hydrates, *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 806-815. DOI: 10.1021/jo502254e
- H26. T. Mizuno, M. Abe, and N. Ikeda, Simultaneous Observation of Triplet and Singlet Cyclopentane-1,3-diyl Diradicals in the Intersystem Crossing Process, *Australian Journal of Chemistry*, **2015**, *68*, 1700-1706. DOI: 10.1071/CH15062.
- H27. *N. Komori, S. Jakkampudi, R. Motoishi, M. Abe, K. Kamada, K. Furukawa, C. Katan, W. Sawada, N. Takahashi, H. Kasai, B. Xue, T. Kobayashi, Design and Synthesis of a New Chromophore, 2-(4-Nitrophenyl)benzofuran, for Two Photon Uncaging using Near-IR Light, *Chemical Communications*, **2016**, *52*, 331-334.

DOI: 10.1039/C5CC07664A.

- H28. J. Ye, S. Hatano, M. Abe, R. Kishi, Y. Murata, M. Nakano, W. Adam, A Puckered Singlet Cyclopentane-1,3-diyol: Detection of the Third Isomer in Homolysis, *Chemistry—A European Journal*, 2016, 27, 2299-2306. DOI: 10.1002/chem.2015039.
- H29. K. Uchida, S. Ito, M. Nakano, M. Abe, T. Kubo, Biphenalenyliidene: Isolation and Characterization of the Reactive Intermediate on the Decomposition Pathway of Phenalenyli Radical, *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138, 2399-2410. DOI:10.1021/jacs.5b13033

【東京大チーム】 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 15 件)

- T1.* Noguchi, J., Nagaoka, A., Watanabe, S., Ellis-Davies, G.C.R., Kitamura, K., Kano, M., Matsuzaki, M. & Kasai H. (2011). *In vivo* two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *J.Physiol.* 589: 2320-2329.
- T2.* Kanemoto, Y., Matsuzaki, M., Morita, S., Hayama, T., Noguchi, J., Senda, N., Momotake, A., Arai, T., & Kasai, H. (2011). Spatial distributions of GABA receptors and local inhibition of Ca²⁺ transients studied with GABA uncaging in the dendrites of CA1 pyramidal neurons. *PLoS ONE*, 6: e22652.
- T3.* Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C.R., Kanemoto, Y., & Kasai, H. (2011). Simultaneous two-photon activation of presynaptic cells and calcium imaging in postsynaptic dendritic spines. *Neural Systems and Circuits* 1:2.
- T4. Ako, R., Wakimoto, M., Ebisu, H., Tanno, K., Hira, R., Kasai, H., Matsuzaki, M. & Kawasaki, H. (2011). Simultaneous visualization of multiple neuronal properties with single-cell resolution in the living rodent brain. *Mol. Cell. Neurosci.*, 48:246-257.
- T5. Ogata, S., Miki, T., Seino, S., Tamai, S., Kasai, H. & Nemoto, T. (2012). A novel function of Noc2 in agonist-induced intracellular Ca²⁺ increase during zymogen-granule exocytosis in pancreatic acinar cells. *PLoS ONE* 7: e37048.
- T6. Cai, T., Hirai, H., Zhang, G., Zhang, M., Takahashi, N., Kasai, H., Satin, L.S., Leapman, R.D. & Notkins, A.L. (2011) Decreased in the number of dense core vesicles is responsible for the impaired secretion of insulin in IA-2 and IA-2β null mice. *Diabetologia*, 54:2347-57.
- T7. Lam, P.*, Ohno, M.*, Subhankar, D.*, He, Y., Qin, T., Lian, T., Zhu, D., Kang, Y., Liu, Y., Kauppi, M., Xie, L., Wan, W., Bin, N., Sugita, S., Olkkonen, V., Takahashi, N., Kasai, H. & Gaisano, H.Y. (2013). Munc18b is a major mediator of insulin exocytosis in rat pancreatic β-cells. *Diabetes*. 62:2416-2428. (* Equal contribution, ^{CA}Corresponding authors.)
- T8.* Hira, R., Ohkubo, F., Ozawa, K., Isomura, Y., Kitamura, K., Kano, M., Kasai, H., & Matsuzaki, M. (2013). Spatial and temporal reconfiguration of microcircuitry activity in the motor cortex for voluntary movement. *J. Neurosci.* 33:1377-1390.
- T9. Hira, R., Ohkubo, F., Tanaka, Y.R., Masamizu, Y., Augustine, G.J., Kasai, H. & Matsuzaki, M. (2013). *In vivo* optogenetic tracing of functional corticocortical connections between motor forelimb areas. *Frontier in Neural Circuits* 7:55.
- T10.* Hayama, T., Noguchi, J., Watanabe, S., Ellis-Davies, G.C.R., Hayashi, A., Takahashi, N., Matsuzaki, M. & Kasai, H. (2013). GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca²⁺ signaling. *Nature Neurosci.* Online Aug 25. doi:10.1038/nn.3496
- T11. Hayashi-Takagi, A., Araki, Y., Nakamura, M., Vollrath, B., Duron, S.G., Yan, Z., Kasai, H., Haganir, R.L., Campbell, D.A. & Sawa, A. (2014) PAKs inhibitors ameliorate schizophrenia-associated dendritic spine deterioration in vitro and in vivo during late adolescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 6461-6. DOI: 10.1073/pnas.1321109111

- T12. Takehara, H. *, Nagaoka, A. *, Noguchi, J., Akagi, T., Kasai, H. & Ichiki, T. (2014). Lab-on-a-brain: Implantable micro-optical fluidic devices for neural cell analysis *in vivo*. *Scientific Report* 4:6721
- T13.* Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G.C.R., Urakubo, H., Ishii, S. & Kasai, H. (2014). A critical time window for dopamine action on the structural plasticity of dendritic spines. *Science*, 345:1616-1620. DOI: 10.1126/science.1255514
- T14.* Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Nakamura, M. Shirai, F., Wu, Y., Loshbaugh, A.L., Kuhlman, B., Hahn, K.M. and Kasai, K. (2015). Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature* (Article), Online on September 9. DOI: 10.1038/nature15257
- T15.* Takahashi, N., Sawada, W., Noguchi, J., Watanabe, S., Ucar, H., Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Ohno, M., Tokumaru, H. & Kasai, H. (2015). Two-photon fluorescence lifetime imaging of SNARE complexes ready for Ca²⁺-dependent exocytosis in presynaptic terminals and beta cells. *Nature Communications*, in press. DOI:10.1038/ncomms9531.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

【電通大チーム】

- D1. *小林孝嘉、カスケード4光波混合による多色レーザーの開発 (Development of multi-color laser by cascaded four-wave mixing)、レーザー加工学会誌 vol. 18, No. 2, pp. 122-124, 2011 (ISSN: 1881-6797)
- D2. *T. Kobayashi, I. Iwakura, and A. Yabushita, "Observation of reaction mechanisms of photoexcited processes using 5-fs pulse", AAPPS Bulletin, AAPPS, vol. 22, No. 1, pp. 4-8, 2012 (ISSN: 0218-2203)
- D3. *小林孝嘉、「極限的超高速広帯域高感度分光法の開発とそれによる化学反応機構の解明: 極短寿命の科学種と遷移状態の観測を通して」、目黒会会報誌 CHOFU Network、Vol.24-1、pp.34-35、2012年4月、社団法人目黒会
- D4. *小林孝嘉、「非常に高速な化学反応における分子構造変化の観測」、化学だいすきクラブ Newsletter、日本化学会化学教育協議会、2013-2号 No.24、pp.8-9、2013年6月20日
- D5. *小林孝嘉、「時間領域研究と周波数領域(コム)研究との関連」、分光研究、Vol.62, No.6, pp.285-300、2013年12月
- D6. *小林孝嘉、貴田祐一郎、「光波混合を用いた分光用の高性能超短パルスレーザー」、レーザー研究、43巻8号、2015年(to be published)
- D7. *小林孝嘉、「誘導放出顕微イメージング法 もう一つの超解像顕微法」、光アライアンス、日本工業出版株式会社、2015年(to be published)
- D8. *T. Kobayashi, "Development of ultrashort pulse lasers in the visible ultrafast and application to spectroscopy ranges", Advances in Multiphoton Processes and Spectroscopy (AMPS), World Scientific Publishing, 23, 2, 2015 (to be published)

【広島大チーム】

- H1.* M. Abe, J. Ye, M. Mishima, The Chemistry of Localized Singlet 1,3-Diradicals (Biradicals): from Putative Intermediates to Persistent Species and Unusual Molecules with a π -Singlet Bonded Character, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 3808-3820. DOI: 10.1039/c2cs00005a.
- H2. M. Abe, Synthesis of macrocyclic lactams and lactones using photochemical dimerization reaction, *EPA News Letter*, **2012**, 83, 70-71.
- H3. 安倍 学, 炭素-炭素 π 単結合の創製による新規 π 電子系の構築, 新材料・新素材シリーズ, 高次 π 空間の創発と機能開発, シーエムシー出版, pp. 16-22, 2013

(ISBN978-4-7813-0758-9 C3043)

- H4.* M. Abe, "Diradicals", Chem. Rev., 2013, 113 (9), 7011-7088. (DOI:10.1021/cr400056a)
- H5. 安倍 学, 新しい π 電子系の化学, CSJ カレントレビュー, 未来材料を創出する π 電子系の科学:新しい合成・構造・機能かに向けて, 化学同人, 2013, Chapter 10, pp112-119.
- H6. Y. Fujii, M. Abe, Selective Formation of Oxetanes Using Photochemical[2+2] cycloaddition Reaction (Paterno-Buchi Reactions), *Kokagaku*, 2013, 44 (1), 2-9.
- H7. R. Takagi, M. Abe, [3+2] Cycloaddition of α,β -Unsaturated Metal-Carbene Complexes, Methods and Applications of Cycloaddition Reactions in Organic Syntheses (Edited by N. Nishiwaki), 2014, Chapter 5.

【東京大チーム】

- T1* Matsuzaki, M. & Kasai, H. (2011). Two-Photon Uncaging Microscopy. Imaging in Neuroscience: A Laboratory Manual (eds.Helmchen and Konnerth). CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- T2. Kasai, H., Takahashi, N. & Tokumaru, H. (2012). Distinct initial SNARE configurations underlying the diversity of exocytosis. *Physiol. Rev.*, 92:1915-1964.

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 27 件、国際会議 45 件)

【電通大チーム】 (国内会議 11 件、国際会議 22 件)

<国内>

- D1. *小林孝嘉、「医学・生物学応用にむけた高性能レーザーの開発:ICORPからCRESTへ」、法政大学本田研究室主催 CREST 講演会シンポジウム『光が拓く細胞解析の最前線』特別講演、法政大学市ヶ谷キャンパス、2011年7月25日
- D2. *小林孝嘉、「高強度究極コヒーレンス光開発用レーザーと同時多色顕微鏡用の高性能レーザーの開発」、サイエンステクノフォーラム月例会 第44回「サイテックサロン」、東京大学駒場キャンパス内 駒場ファカルティハウス、2011年8月27日
- D3. *小林孝嘉、「振動実時間分光法による生体高分子の超高速過程」、理研シンポジウム「第2回 広がる原子分子物理研究: 先端光技術で切り開く新しい原子分子物理」、(独)理化学研究所 大河内記念ホール、2011年12月2日
- D4. *小林孝嘉、「医学・生物学応用にむけた高性能レーザーの開発:ICORPからCRESTへ」、法政大学本田研究室主催 CREST 講演会シンポジウム『光が拓く細胞解析の最前線』特別講演、法政大学市ヶ谷キャンパス、2011年7月25日
- D5. *小林孝嘉、「フェムト秒パルスのコントラスト向上」、レーザー研シンポジウム 2012、大阪大学医学部銀杏会館、2012年4月17日
- D6. *小林孝嘉, J. Liu, J. He、「超短パルスの新しいコントラスト増強法」、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、2012年6月8日
- D7. *小林孝嘉、「超短パルスレーザーの開発とそれを用いた超高速反応の研究」、神奈川大学工学研究科講演会(物性生命科学専攻 小出芳弘)、神奈川大学23館203教室、2012年10月10日
- D8. 小林孝嘉、「カーボンナノチューブ及びトポロジカル絶縁体の超高速緩和過程」、第5回超高速光エレクトロニクス研究会、箱根強羅 ラフォーレ強羅、2012年12月7-8日 r
- D9. *B. Xue, T. Kobayashi, "Measurement of non-degenerate two photon absorption spectrum by using super continuum beam", 第9回農工大・電通大合同シンポジウム、2012年12月15日
- D10. *B. Xue and T.Kobayashi, "Development of sub10fs UV and DUV lasers and their applications to ultrafast spectroscopy", 第34回レーザー学会年次大会A部門(レーザー物理・化学)、北九州国際会議場(北九州市)、2014年1月20日(月)~22日(水)

- D11. *小林孝嘉、「サブ 10 fs 可視・紫外・深紫外レーザーの開発と新奇フォトニクス材料の超高
速応答の研究」(基調講演)、第6回超高速フォトニクスシンポジウム、東北大学電気通信研
究所、2014年11月6日(木)

<国際>

- D1. T. Kobayashi, Z. Nie, J. Du, H. Kataura, Y. Sakakibara, and Y. Miyata, "Real-time observation of coherent phonon dynamics in single-walled carbon nanotubes using a few-cycle pulse laser", 2011 International Conference on Luminescence (ICL), Ann Arbor, Michigan, USA, June. 27-Jul. 1, 2011 r
- D2. *A. Yabushita, Y.-H. Lee, T. Kobayashi, "Development of fast-scan ultrafast spectroscopy system", 29th Symposium on Spectroscopic Technologies and Surface Sciences, Hsinchu, Taiwan, Jul.21-23, 2011
- D3. *T. Kobayashi and J. Du, "Ultrafast process in chlorophyll a", XXV International Conference on Photochemistry (ICP2011), Beijing, China, Aug. 7-12, 2011
- D4. T. Kobayashi, "The primary processes in chlorophyll", 2011 Workshop on Physical Study of Photosynthesis (organized by CAS Beijing), Beijing, China, Oct. 31, 2011
- D5. T. Kobayashi, J. Liu, A. Yabushita, and S. Taniguchi, "Time-resolved spectroscopy of photoactive protein in bacteria by a sub-8 fs pulse laser at 400 nm", Studies of Nano and Bio-Materials using Laser, X-ray and Single-Molecule Techniques, Academia Sinica, Nankang, Taiwan, Nov. 17-18, 2011
- D6. *T. Kobayashi, "Development of ultrashort ultraviolet laser, deep ultraviolet laser and CEP stabilized near infrared-visible near monocycle pulse laser", International Symposium on Physics and Applications of Laser Dynamics 2011 (IS-PALD 2011), Tainan, Taiwan, Dec. 7-8, 2011
- D7. *T. Kobayashi, "Ultrafast pulse cleaning", Frontiers in ultrafast optics, National Tsing Hua University, Apr. 5, 2012
- D8. *J. Liu and T. Kobayashi, "Application of self-diffraction process in the cleaning and measurement of femtosecond pulse", The 1st Advanced Lasers and Photon Sources Conference (ALPS'12), Yokohama, Japan, Apr.26-27, 2012
- D9. *T. Kobayashi, J. Liu, A. Yabushita, S. Taniguchi, "Ultrafast spectroscopy of photoactive yellow protein by a sub-8fs pulse in near UV region", The 8th Asia Pacific Laser Symposium (APLS2012), Huangshan City, Anhui, China, May 27-29, 2012
- D10. *T. Kobayashi, "Cleaning and measurement of femtosecond pulse by using self-diffraction process in bulk medium", IS-PALD 2012, the National Cheng Kung University, Tainan, Nov. 7 - 9, 2012
- D11. T. Kobayashi Z. Nie, J. Du, H. Kataura, Y. Sakakibara, and Y. Miyata, "Ultrafast structural change in single-walled carbon nanotubes using a few-cycle pulse laser", The 12th International Symposium on advanced Organic Photonics(ISAOP-12), Naha, Japan, Dec.3-4, 2012 r
- D12. *T. Kobayashi, "Simultaneous Measurement of Electronic and Vibrational Dynamics in a Polyacetylene Derivative Studied by a Few-cycle Pulse Laser", ICMAT 2013, The 7th International Conference on Materials for Advanced Technologies, Singapor, Jun. 30 -Jul. 5, 2013
- D13. A. Yabushita, T. Kobayashi, "Carrier-envelope phase locked laser pulse with continuous color tunability", "The 9th International Symposium on Modern, Optics and Its Applications 2013, Bandung, Indonesia, Jun. 24-27, 2013
- D14. T. Kobayashi, J. Liu, "Coherent phonon coupled with exciton in semiconducting single-walled carbon nanotubes using a few-cycle pulse laser", DPC 2013 The 18th International Conference on Dynamical Processes in Excited States of Solids, Fuzhou, China, Aug.4-9, 2013
- D15. T. Kobayashi, Coherent phonon coupled with exciton in semiconducting

single-walled carbon nanotubes using a few-cycle pulse laser, Carbon-Based Nano-Materials and Devices, Promised Land Resort & Lagoon, Hualien, Taiwan, Nov.3-8, 2013

- D16. *T. Kobayashi, X. Bing, A. Yabushita, and J. Du, "Ultrafast spectroscopy using sub-10fs visible, UV, and DUV lasers", 2014 International Symposium on Laser and Computational Biophysics, East China Normal University, June 15-17, 2014
- D17. *T. Kobayashi, "Stable Sub-10 Femtosecond deep ultraviolet laser source for ultrafast spectroscopy", IS-PALD 2014, NCTU, Taiwan, September 2 - 5, 2014
- D18. *Y.-K. Ko, A. Yabushita, C.-W. Luo, T. Kobayashi, S.-C. Hung, and C.-H. Kao, "30 fs Ultrashort Pulse Generation at 400 nm by Self-Phase Modulation", IS-PALD 2014, NCTU, Taiwan, September 2 - 5, 2014
- D19. *T. Kobayashi, "Development of Ultrafast Laser and Application to Ultrafast Spectroscopy of Novel Materials", special Presentation hosted by N. Peyghambarian College of Optical Science, University of Arizona, October 23, 2014
- D20. *T. Kobayashi, "Ultrafast spectroscopy and high resolution microscopy", 南京、中国、February 10, 2014
- D21. *T. Kobayashi, "Development of DUV, UV, visible, IR ultrashort pulse lasers and their applications to carbon nanotubes and topological insulators", Irigo Conference 2015, Irigo, Japan, October 22-23, 2015
- D22. T. Kobayashi, "Annealing effect on the performance of P3HT:PCBM solar cells by ultrafast spectroscopy", Pacificchem 2015, Honolulu, Hawaii, USA, December 15 - 20, 2015

【広島大チーム】(国内会議 1 件、国際会議 10 件)

<国内>

- H1.* 安倍 学, 「2光子吸収に優れたケージド化合物の合成とアンケーシング」, 新学術領域研究「感応性化学種が拓く新物質科学」研究フォーラム「生体関連感応性化学種」, 東京, 2014年10月13日

<国際>

- H1. M. Abe, "Interplay Between Computations and Experiments: A Case Study on Biradicals", Applied Theory On Molecular Systems, CSIR-IICT, Hyderabad, India, November 2-5, 2011.
- H2. *M. Abe, "Substituent Effect on the Reactivity of Triplet Excited State of Cyclic Azoalkanes: α -CN Cleavage versus β -CC Cleavage Reaction", 2011 Korean-Japan Bilateral Symposium on Frontier Photoscience (2011KJFP), Seoul, Korea, October 28-31, 2011.
- H3. M. Abe, "Spin alignment in tetraradicals, based on the substituent effect on the ground state spin-multiplicity of localized 1,3-diyls", The 6th Taiwan-Japan Bilateral Symposium on Architecture of Functional Organic Molecules, Faculty Club, Hiroshima University, Hiroshima, Japan, August 18-20, 2011.
- H4. Manabu Abe, Regio- and Stereoselective Formation of Oxetanes Using Radical Ion Pairs and Triplet 1,4-Diradicals, International Symposium on Chemistry and Chemical Biology of Natural Products, Hyderabad, India, August 3, 2012.
- H5. Manabu Abe, Regio- and Stereoselective Formation of Oxetanes Using Radical Ion Pairs and Triplet 1,4-Diradicals, 2013 Korean-Japan Bilateral Symposium on Frontier Photoscience (2013KJFP), Seoul, Korea, November 25-27, 2013.
- H6. *Manabu Abe, Caged Glutamate with p-Extended 1,2-Dihydronaphthalene Chromophore: Design, Synthesis, Two-Photon Absorption (TPA) Property, and Photochemical Reactivity, The 8th Taiwan-Japan Bilateral Symposium on Architecture of Functional Organic Molecules, Fukuoka, Japan, November 27-29,

2014

- H7. Envelop Form of Singlet Cyclopentane-1,3-diyls: Crucial Role in Stereoselectivity in the Photochemical Denitrogenation of Cyclic Azoalkanes, 22nd IUPAC International Conference on Physical Organic Chemistry, Ottawa, Canada, August 10-15, 2014.
- H8. *Manabu Abe, Caged Glutamates with π -Extended 1,2-Dihydronaphthalene Chromophore: Design, Synthesis, Two Photon Absorption (TPA) Property, and Photochemical Reactivity, The 10th Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, Seoul, Korea, June 21-23, 2014.
- H9. *Manabu Abe, Design and Synthesis of a New Chromophore with Two-photon Absorption (TPA) Property, 2-(4-Nitrophenyl)benzofuran (NPBF), and Its Application to Two-photon (TP) Uncaging reaction using Near IR Light, The 10th Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, Cheju, Korea, June 26-28, 2015.
- H10. Manabu Abe, Substituent Effect on the Long-wavelength Emission from Cyclopropane Derivatives, Gordon Research Conference on Photochemistry, Easton, USA, July 19-24, 2015.

【東京大チーム】 (国内会議 15 件、国際会議 13 件)

<国内>

- T1.* Haruo Kasai (2010.11.10) Optical stimulation illuminates synapses in the mammalian brain. 新学術領域「分子行動学」Symposium 2010 (Tokyo)
- T2.* Haruo Kasai (2010.12.15) Imaging of synapses. BSI tutorial course 2010 (和光)
- T3. Haruo Kasai (2011.3.13) Statistical dynamics of synapses. System Neurobiology Spring School (Kyoto)
- T4. 高橋倫子 (2011.5.19) 睥島におけるインスリン開口分泌機構の可視化解析, リー賞受賞講演, 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (札幌)
- T5. Noriko Takahashi, Mitsuyo Ohno, Haruo Kasai (2011.5.19) SNARE conformation and insulin exocytosis, 第54回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム (札幌)
- T6.* Haruo Kasai (2011.10.28) GABA dependence of synaptic competition in dendritic spines. Max-Planck-Institute/U-Tokyo Symposium (Tokyo).
- T7.* Haruo Kasai (2011.12.07). Synaptic competition in the dendritic spines of CA1 pyramidal neurons. 高等研シンポジウム (Nara).
- T8.* 河西春郎、高橋倫子、大野光代、澤田和可子 (2012.6.1). 2光子蛍光寿命画像法による開口放出 SNARE 機構の研究 (Two-photon FRET/FLIM imaging of SNARE dependent exocytosis). 日本腎臓学会 (横浜).
- T9. 河西春郎 (2012.6.20). 大脳スパインシナプスの形態可塑性と揺らぎ, 揺らぎ研究会、理化学研究所 (和光).
- T10.* H. Kasai (2013.9.5). Imaging synaptic function and plasticity. MRC-JST-British Embassy Tokyo Workshop: The use of next generation optical microscopy for neuroscience disease challenges (Tokyo).
- T11.* H. Kasai (2013.9.8). 革新的な脳計測・解析技術、「こころの健康社会の創造に向けて」、日本学術会議主催学術フォーラム (東京)
- T12.* 高橋倫子、澤田和可子、渡辺恵、河西春郎 (2014.11.7) 2光子励起画像法による蛋白質複合体の評価、第34回表面科学学術講演会 くにびきメッセ シンポジウム (松江)
- T13.* 河西春郎、林(高木)朗子、柳下祥、根岸真紀子 (2015.4.12) 大脳の記憶素子である樹状突起スパインの2光子顕微鏡によるイメージング, 第29回日本医学会総会 (京都).
- T14.* 柳下 祥, 河西 春郎 (2015.7.30) ドーパミンの側坐核中型有棘細胞への作用機構, 第38回日本神経科学大会 (神戸)
- T15.* 高橋 倫子, 澤田 和可子, 野口 潤, 渡辺 恵, 河西 春郎 (2015.7.30) SNARE configuration at presynaptic terminals analyzed with 2-photon excitation FLIM, 第

38 回日本神経科学大会(神戸)

<国際>

- T1.* Haruo Kasai (2010.10.11) SNARE conformational changes that prepare vesicle for exocytosis. Symposium on New Horizon in Ca signaling, Biophysical Meeting. (Beijing, China).
- T2.* Haruo Kasai (2011.7.5) Monitoring dynamics of single synapses during circuit plasticity. IBRO summer course (Korea)
- T3.* Haruo Kasai, Mitsuyo Ohno, Wakako Sawada, Satoshi Watanabe, Noriko Takahashi (2011.11.1). Two-photon FRET/FLIM imaging of SNARE dependent exocytosis. IUPAB (Beijing, China).
- T4.* Haruo Kasai (2012.5.24) Structural plasticity of spine synapses studied with two-photon microscope. International Symposium on in vivo microscopy (Helsinki, Finland).
- T5.* Haruo Kasai, Tatsuya Hayama, Jun Noguchi, Satoshi Watanabe (2012.6.30) Synaptic competition in the dendritic spines. Jacques-Monod Symposium in "Imaging neuronal functions: from molecules to circuits," (Roscoff, France).
- T6.* H. Kasai (2013.7.19). Structural plasticity of spine synapses in vitro and in vivo, current trends and future directions of synaptic plasticity research, US/Japan joint workshop (Seattle, USA).
- T7.* H. Kasai (2013.9.5). Imaging synaptic function and plasticity. MRC-JST-British Embassy Tokyo Workshop: The use of next generation optical microscopy for neuroscience disease challenges (Tokyo).
- T8. H. Kasai & A. Hayashi (2014.4.2) Labeling and erasure of dendritic spines and motor learning with novel synaptic optogenetic probes *in vivo*. Janelia Conference for "Structure and function of synapses" (Dulles, USA)
- T9.* H. Kasai & S. Yagishita (2014.5.10) A critical time window for dopamine actions on the dendritic spines in ventral striatum. Max-Planck-Institute/U-Tokyo Symposium (Florida, USA).
- T10.* H. Kasai & S. Yagishita (2014.8.5) A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. Gordon Research Conference on Synaptic Transmission (New Heaven, USA).
- T11.* H. Kasai (2014.10.27) Functional connectomic analysis of cell assemblies via synaptic optogenetics. KIST symposium (Seoul).
- T12.* H. Kasai (2015.2.12) Imaging and optogenetics of dendritic spines. BSI seminar series (Wako).
- T13.* H. Kasai (2015.3.26) Dendritic spine dynamics underlying animal behaviors, Keynote speaker, Academia Europea Symposium (Cardiff, UK)

② 口頭発表 (国内会議 31 件、国際会議 40 件)

【電通大チーム】 (国内会議 25 件、国際会議 40 件)

<国内>

- D1. *T. Kobayashi、J. Liu、Temporal contrast improvement of femtosecond pulses by a self-diffraction process in a Kerr bulk medium、レーザー学会学術講演会第 31 回年次大会、電気通信大学、平成 23 年 1 月 9 日(日)~1 月 10 日(月)
- D2. Z. Nie、K. Okamura and T. Kobayashi、Real-time Observation of resonant coherent phonon dynamics in single-walled carbon nanotubes by a few-cycle pulse laser、レーザー学会学術講演会第 31 回年次大会、電気通信大学、平成 23 年 1 月 9 日(日)~1 月 10 日(月)r
- D3. *貴田祐一郎、Jun Liu、小林孝嘉、プリズム圧縮器を併用した深紫外フェムト秒パルス圧縮、レーザー学会学術講演会第 31 回年次大会、電気通信大学、平成 23 年 1 月 9 日(日)

～1月10日(月)

- D4. *岡村幸太郎、小林孝嘉、搬送波包絡位相安定可視近赤外超広帯域サブ 3fs パルス光源の開発、レーザー学会学術講演会第31回年次大会、電気通信大学、平成23年1月9日(日)～1月10日(月)
- D5. 谷口誠治、コスロービアン・ハイク、Jun Liu、小林孝嘉、「sub-10fs ポンプ・プローブ計測による光活性黄色蛋白質(PYP)の光初期異性化ダイナミクス」、2011年光化学討論会、宮崎市河畔コンベンションエリア、2011年9月6-8日
- D6. 沼田雄大、中川和哉、石野平祐、石井行弘、小林孝嘉^A、徳永英司(東理大理、電通大・先端レーザー研^A)、「有機ナノ結晶の広角前方・後方散乱光の非線形分光」、物理学会2012年秋季大会、横浜国立大学常磐台キャンパス、2012年9月18日-21日
- D7. 雪田俊平、塩川直幸、大澤健吾、小林孝嘉^A、徳永英司(東理大理、電通大量子・物質^A)、「バルク水のポッケルス効果」、物理学会2012年秋季大会、横浜国立大学常磐台キャンパス、2012年9月18日-21日
- D8. 中田和明、小林孝嘉^A、徳永英司(東理大理、電通大先端レーザー研^A)、「pHによるポルフィリンJ会合体水溶液の電場変調信号の変化」、物理学会2012年秋季大会、横浜国立大学常磐台キャンパス、2012年9月18日-21日
- D9. 長谷川大祐、中田和明、小林孝嘉^A、徳永英司(東理大理、電通大先端レーザー研^A)、「光と電場によるシアニン色素THIATSの状態(J会合体とモノマー)の制御」、物理学会2012年秋季大会、横浜国立大学常磐台キャンパス、2012年9月18日-21日
- D10. 中川和哉、沼田雄大、石野平祐、小林孝嘉^A、徳永英司(東理大理、電通大先端レーザー研^A)、「ペリレン分子の非共鳴励起発光」、物理学会2012年秋季大会、横浜国立大学常磐台キャンパス、2012年9月18日-21日
- D11. 沼田雄大、西山祐介、中川和哉、石野平祐、小林孝嘉^A、徳永英司(東理大理、電通大・先端レーザー研^A)、「有機ナノ結晶のサイズ効果と光散乱」、物理学会2013年春季大会、広島大学、2012年3月26日(火)～29日(金)
- D12. 大澤健吾、雪田俊平、塩川直幸、小林孝嘉^A、徳永英司(東理大理、電通大先端レーザー研^A、東理大グリーン&セーフティ研)、「気液界面の水のポッケルス効果」、物理学会2013年春季大会、広島大学、2012年3月26日(火)～29日(金)
- D13. 雪田俊平、塩川直幸、大澤健吾、小林孝嘉^A、徳永英司(東理大理、電通大量子・物質^A)、「バルク水の異常ポッケルス効果」、物理学会2013年春季大会、広島大学、2012年3月26日(火)～29日(金)
- D14. 中田和明、小林孝嘉^A、徳永英司(東理大理、電通大先端レーザー研^A)、「ポルフィリンマクロ会合体形成による電気光学効果の一万倍の増大」、物理学会2013年春季大会、広島大学、2012年3月26日(火)～29日(金)
- D15. 西山祐介、沼田雄大、中川和哉、石野平祐、小林孝嘉^A、徳永英司(東理大理、電通大・先端レーザー研^A)、「鋭い共鳴吸収を持つ散乱体の非線形分光」、物理学会2013年春季大会、広島大学、2012年3月26日(火)～29日(金)
- D16. 小林孝嘉、「フェムト秒パルスコントラストの向上」、平成24年度共同研究成果報告会「レーザー研シンポジウム2013」、大阪大学銀杏会館、2013年5月8日(水)～9日(木)
- D17. A. Yabushita, C.-H. Kao, Y.-H. Lee, T. Kobayashi “Ultrafast spectroscopy of polythiophene derivative P3HT”, 2013 Autumn Meeting, The Physical Society of Japan, The University of Tokushima, Tokushima, Japan, Sept. 27, 2013
- D18. *瀬戸 啓介^{1,2}, 塚田 敏明³, 奥田 良直⁴, 徳永 英司⁴, 小林 孝嘉^{1,2}(電通大先端レーザー¹, CREST², 計測ソリューション³, 理科大物⁴)、「強雑音白色プローブ光を用いる同時多波長計測に適したバランス検出法」、2014年第61回応用物理学会春季学術講演会、青山学院大学相模原キャンパス、2014年3月17日(月)～20日(木)
- D19. C. - W. Luo, C. M. Tu, T. T. Yeh, H. -Ju Chen, S. A. Ku, J.-Y. Lin, K. H. Wu, J. Y. Juang, T. Kobayashi A, C.-M. Cheng B, C.-H. Chen B, K.-D. Tsuei B, H. Berger C, R. Sankar D, F. C. Chou D, K. Kokh E, G. Gu F (National Chiao Tung Univ., Univ.

of Electro-Communications A, National Synchrotron Radiation Research Center B, Institute of Physics of Complex Matter C, National Taiwan Univ. D, Novosibirsk State Univ. E, Brookhaven National Laboratory F), "Ultrafast Infrared Response of Dirac Fermions in Topological Insulators", 日本物理学会第 69 回年次大会、東海大学 湘南キャンパス、2014 年 3 月 27 日(木) ~ 3 月 30 日(日)27aCK-6

- D20. Y. T. Wang, C. W. Luo, A. Yabushita, K. H. Wu, T. Kobayashi, and L. J. Li (Dept. of Electrophysics, Nat'l. Chiao Tung Univ., Advanced Ultrafast Laser Res. Center, The Univ. of Electro-Communications A, Inst. of Atomic and Molecular Sci., Academia Sinica B), 「単層 MoS₂ の valley polarization の超高速動力学」"Ultrafast dynamics of valley polarization in monolayer MoS₂", 日本物理学会第 69 回年次大会、東海大学 湘南キャンパス、2014 年 3 月 27 日(木) ~ 3 月 30 日 29pAK-12
- D21. *小林孝嘉、劉 軍、"カスケード四光波混合を用いた新奇光パルス雑音低減と特性評価法、Applications of cascaded four-wave mixing to contrast enhancement for clean beam generation and characterization", 日本分光学会年次講演会、理化学研究所 和光キャンパス 鈴木梅太郎記念ホール、2014 年 5 月 26 日(月)~28 日(水)
- D22. *小林孝嘉、何晋平、"カスケード四光波混合を用いた DUV サブ 20-fs パルス発生 Sub 20-fs DUV pulses generated by chirped-pulse four-wave mixing in bulk material", 日本分光学会年次講演会、理化学研究所 和光キャンパス 鈴木梅太郎記念ホール、2014 年 5 月 26 日(月)~28 日(水)
- D23. *瀬戸啓介、奥田良直、塚田敏秋、徳永英司、小林孝嘉、"分光イメージングに適した新奇バランス検出法の開発と多色誘導ラマンイメージングへの応用", 日本分光学会年次講演会、理化学研究所 和光キャンパス 鈴木梅太郎記念ホール、2014 年 5 月 26 日(月)~28 日(水)
- D24. *宮崎淳、川角洸史、小林孝嘉、"湯川ポテンシャル散乱型のフォトサーマル顕微鏡による生体組織の高感度・高解像イメージング", 第 62 回応用物理学会春季学術講演会、東海大学 湘南キャンパス、2015 年 3 月 11 日(水) ~14 日(土)
- D25. *宮崎淳、"高解像フォトサーマル顕微鏡による生体組織の 3 次元多色イメージング", 日本分光学会、東京工業大学 大岡山キャンパス デジタル多目的ホール、2015 年 6 月 1 日(月)~6 月 3 日(水)

<国際>

- D1. *T. Kobayashi, and A. Yabushita, "Ultrafast dynamics of excited state in oxy-hemoglobin", The 5th International Symposium on Ultra-fast Phenomena and Terahertz Waves(5th ISUPTW), Xi'an, China, Sept. 12, 2010
- D2. C.-S.O Hsu, Y.-H. Lee, A. Yabushita, T. Kobayashi, S.-Da, "Self-referenced direct spectral phase retrieval of few-cycle ultrashort pulses by modified interferometric field autocorrelation", Dec.3-4, 2010
- D3. H.-P. Lo, A. Yabushita, C.-W. Luo, P. Chen, and T. Kobayashi, "Beamlike polarized entangled photon-pair generation", The 5th Asia-Pacific Workshop on Quantum Information Science in conjunction with the Festschrift in honor of Vladimir Korepin, Nanyang Executive Centre, Singapore, Mar. 26, 2011 r
- D4. *A. Yabushita, Y. H. Lee, T. Kobayashi "Ultrafast dynamics of bound polaron pair in P3HT film", JPS the 66th Annual Meeting, Niigata, Japan, Mar. 27, 2011
- D5. *Y. Kida, J. Liu, T. Kobayashi, "10-fs deep-ultraviolet pulses without second- and third-order dispersions", Conference on Lasers and Electro-Optics International Quantum Electronics Conference (CLEO 2011), Baltimore, Maryland, USA, May 1-6, 2011
- D6. *T. Kobayashi, I. Iwakura and A. Yabushita, "Kinetic isotope effect on the proton-transfer in indigo carmine directly observed by real-time vibrational

- spectroscopy few-cycle pulse Laser”, ISOTOPES 2011, Provence, France, Jun.20-24, 2011
- D7. J. Du, T. Teramoto, and T. Kobayashi, “Spectral oscillation in chlorophyll a revealed by ultrafast real-time vibrational spectroscopy”, Nonlinear Optics (NLO), Kauai, Hawaii, USA, Jul. 17-22, 2011
- D8. *J. Liu, T. Kobayashi, “Cleaning of femtosecond pulses by a self-diffraction process in a Kerr bulk medium”, Nonlinear Optics (NLO), Kauai, Hawaii, USA, Jul. 17-22, 2011
- D9. *J. Liu and T. Kobayashi, “Femtosecond pulse cleaning and measurement using self-diffraction process”, 2011 IQEC / CLEO Pacific Rim, Sydney, Australia, Aug. 28 –Sep. 1, 2011
- D10. *T. Kobayashi and J. Liu, “Cleaning and measurement of femtosecond pulse by using self-diffraction process in bulk medium”, Ultrafast Optics VIII 2011 (UFOs VIII 2011), Monterey, CA., USA, Sep.26-30, 2011
- D11. *T. Kobayashi, and Y. Kida, “Vibrational dynamics resolved with sub-10-fs deep-ultraviolet pulses (UP 64)”, XVIII International Conference on Ultrafast Phenomena (UP 2012), Lausanne, Switzerland, Jul. 8-13, 2012
- D12. J. Du, T. Kobayashi, K. Watanabe, and H. Tamiaki, “B-side Electron Transfer in Bacterial Photosynthetic Reaction Centers Revealed by a Few-Cycle Pulse Laser”, XVIII International Conference on Ultrafast Phenomena (UP 2012), Lausanne, Switzerland, Jul. 8-13, 2012
- D13. T. Kobayashi, Z. G. Nie and J. Du, “Coherent phonon coupled with exciton in semiconducting single-walled carbon nanotubes using a few-cycle pulse laser”, the 10th International Conference on Excitonic Processes in Condensed Matter (EXCON 2012), Groningen, The Netherlands, Jul. 1-6, 2012 r
- D14. *G. Marcus, Y. Deng, X. Gu, W. Helml, R. Hartmann, T. Kobayashi, L. Strueder, R. Kienberger, and F. Krausz, “K-shell electron excitation using Carrier Envelope Phase Stabilized 2-Cycles IR (2.1 μ m) Radiation Source”, Ultrafast Optics IX (UFO 2013), Davos, Switzerland, Mar.4-8, 2013
- D15. T. Kobayashi, D. Hasegawa, K. Nakata, E. Tokunaga, O. Kotaro, J. Du., “Time-resolved spectroscopy of J-aggregates with sub-10-fs resolution”, TRVS2013, Beppu, Japan, May 19-24, 2013
- D16. A. Yabushita, C.-H. Kao, D.-Y. Juang, A. Baltuska, T. Kobayashi, “Multi-color carrier-envelope phase locked pulse with continuous color tunability”, International Conference on Coherent and Nonlinear Optics (ICONO) / Conference on Lasers, Applications, and Technologies (LAT), Russian Academy of Science, Moscow, Russia, Jun. 18, 2013
- D17. A. Yabushita, C.-H. Kao, Y.-H. Lee, H.-S. Wu, T. Kobayashi, “Ultrafast time-resolved spectroscopy of photovoltaic polymer P3HT film and its benzene solution”, International Conference on Coherent and Nonlinear Optics (ICONO) / Conference on Lasers, Applications, and Technologies (LAT), Russian Academy of Science, Moscow, Russia, Jun. 19, 2013
- D18. *T. Kobayashi, “Coherent Phonon Coupled with Exciton in Semiconducting Single-walled Carbon Nanotubes Using a Few-cycle Pulse Laser”, ICMAT 2013 The 7th International Conference on Materials for Advanced Technologies, Singapore, Jun. 30 –Jul. 5, 2013
- D19. *A. Yabushita, T. Kobayashi, “Carrier-envelope phase locked laser pulse with continuous color tunability”, The 9th International Symposium on Modern Optics and Its Applications 2013, Bandung, Indonesia, Jun. 24-27, 2013
- D20. J. He, T. Kobayashi, “Observation of Beam Breakup During Cascaded Four-Wave Mixing Process”, CLEO-PR&OECC/PS 2013, Kyoto, Japan, Jun. 30-Jul. 4, 2013
- D21. B. Xue, T. Kobayashi, J. Du, “A New Method of Two-Photon Absorption Spectrum Measurement by Supercontinuum”, CLEO-PR&OECC/PS 2013, Kyoto, Japan,

- Jun. 30-Jul. 4, 2013
- D22. J. Du T. Kobayashi, M. Virkki and M. Kauranen, "Surface-enhanced Broad-band Real-time Vibrational Spectroscopy", CLEO-PR&OECC/PS 2013, Kyoto, Japan, Jun. 30-Jul. 4, 2013
- D23. *T. Kobayashi, J. Liu, "Applications of cascaded four-wave mixing to contrast enhancement and characterization of femtosecond pulse and multicolor source", NLO 2013 2013, Hawaii, US, Jul. 21-26, 2013
- D24. *T. Kobayashi, Jun Liu, "Coherent phonon coupled with exciton in semiconducting single-walled carbon nanotubes using a few-cycle pulse laser", DPC 2013 The 18th International Conference on Dynamical Processes in Excited States of Solids, Fuzhou, China, Aug.4-9, 2013
- D25. *T. Kobayashi, "Possibility of multi-color imaging with several light Sources", Nano-S&T 2013, Xian, China, Sep.26-28, 2013
- D26. Yabushita, Y.-H. Lee, C.-H.Kao, H.-S.Wu, T. Kobayashi, "Ultrafast dynamics of photovoltaic polymer P3HT in a film and its benzene solution studied by using sub-10 fs visible pulse", 28th European PV Solar Energy Conference and Exhibition Parc des Expositions Paris Nord Villepinte, Paris, France, Sept. 30, 2013
- D27. Yabushita, T. Kobayashi, P.-F. Cheng, Y. Hwu, K.S. Liang, "Ultrafast time-resolved spectroscopy of nitric oxide protein eNOS", Chih-Chang Hong, The 6th International Workshop on FEL Science: New Horizon of XFEL Science, Shangri-La Far Eastern Plaza Hotel, Tainan, Taiwan, Nov.6, 2013
- D28. Yabushita, Y.-H. Lee, H.-S. Wu, T. Kobayashi, "Ultrafast spectroscopy of photovoltaic polymer P3HT in its solution", Chih-Hsien Kao, The 13th Pacific Polymer Conference, Grand Hi-Lai Arena, Kaohsiung, Taiwan, Nov.17, 2013
- D29. *T. Kobayashi, "Ultrafast spectroscopy using sub-10fs visible, UV, and DUV pulses", The 4th Asian Spectroscopy Conference, Nanyang Technological University, Dec15-18, 2013
- D30. Y.-T. Wang, C.-W. Luo, A. Yabushita, K.-H. Wu, T.Kobayashi, L.-. Li, "Ultrafast dynamics of valley polarization in monolayer MoS₂", Annual Meeting of the Physical Society of Republic of China, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, January 21 - 23 , 2014
- D31. P. C. Cheng, C. W. Luo, Y. R. Chu, W. Y. Tzeng, J.-Y. Lin, K. H. Wu, J. Y. Juang, T. Kobayashi, A.Golovanov, A. Vasiliev, "Quasiparticle Dynamics of Fe-based chalcogenide (Na_{0.32}K_{0.68})_{0.95}Fe_{1.75}Se₂ single crystal", Annual Meeting of the Physical Society of Republic of China, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, January 21 - 23 , 2014
- D32. *A. Yabushita, C.-H. Kao, T. Kobayashi, "Spectral shaping and continuous tuning of multi-color carrier-envelope phase locked pulse", UP2014, Okinawa Convention Center, July 7 - 11, 2014
- D33. *T. Kobayashi, "Sub-10 fs DUV Laser Pulses and Their Application to Ultrafast Molecular Spectroscopy and Dynamics", the Frontiers in Optics/Laser Science, Arizona, USA, October 19-23, 2014
- D34. *T. Kobayashi, "Application of lasers for the materials science and bioscience", IWMST 2014, Wuhan University of Science and Technology, China, October 30 - 31, 2014
- D35. *T. Kobayashi, "Stable Sub-10 Femtosecond Deep Ultraviolet Laser Source for Ultrafast Spectroscopy", ASSL 2014, Hilton Shanghai Hongqiao, Shanghai, China, November 17-21, 2014
- D36. *J.-P. He, J. Miyazaki, N. Wang, and T. Kobayashi "Label-free imaging biological tissues with nonlinear photothermal microscopy", CLEO2015, San Jose Convention Center, San Jose, USA, May 10-15 2015
- D37. *T. Kobayashi, J. He, N. Wang, J. Miyazaki, "Nonlinear photothermal microscopy

for biological imaging”, NLO2015, Kaua'i Marriott Resort, Lihue, Hawaii, USA, July 26–31, 2015

- D38. *T. Kobayashi, and N. Wang “Subtraction threshold for fluorescence difference microscopy”, NLO2015Kaua'i Marriott Resort, Lihue, Hawaii, USA, July 26–31, 2015
- D39. *T. Kobayashi, and B. Xue, “Ultrafast dynamics by sub 10 fs deep ultraviolet pulse excitation for cytosine in aqueous solution”, UFO 2105, Beijing, China, August 16-21, 2015
- D40. *T. Kobayashi, “Sub-diffraction-limit imaging using mode multiplexing, SPIE Scanning Microscopies, Monterey, USA, September 29 - October 1, 2015

【広島大チーム】(国内会議 4 件、国際会議 0 件)

<国内>

- H1. 安倍 学・三島 愛・藤原 好恒・石橋 孝章・背山 信, レーザーフラッシュフォトリソ法を用いた長寿命一重項ジラジカルの発生とその反応挙動に関する研究, 2012 年光化学討論会, 東京工業大学 大岡山キャンパス, 2012年9月12日
- H2. 多田早織・安倍 学, 一重項オクタヒドロペンタレン-1,3-ジラジカルの閉環反応の立体選択性, 学習院大学目白キャンパス, 2013年9月6日
- H3. 藤井良美・内橋賢吾・安倍 学, アリルアルコールやアリルアミン類の光[2+2]付加環化反応の選択性, 愛媛大学城北地区, 2013年9月12日
- H4. 内橋賢吾・安倍 学, 「アリルアミン誘導体の光[2+2]付加環化反応の開発」, 2014 年光化学討論会, 北海道, 2014 年 10 月 11 日

【東京大チーム】(国内会議 2 件、国際会議 0 件)

<国内>

- T1. 大野光代 高橋倫子 河西春郎 (2011.5.21) SNARE 蛋白の膜拡散 によるインスリン分泌調節の 2 光子顕微鏡による解析、第 54 回日本糖尿病 学会年次学術集会 (札幌)
- T2.* 高橋倫子、大野光代、澤田和可子、河西春郎、(2012.3.30). 2光子蛍光寿命画像法による開口放出 SNARE 機構の研究 (Two-photon FRET/FLIM imaging of SNARE dependent exocytosis). 日本生理学会 (松本).

③ ポスター発表 (国内会議 60 件、国際会議 21 件)

【電通大チーム】(国内会議 37 件、国際会議 7 件)

<国内>

- D1. *貴田祐一郎、Jun Liu、小林孝嘉、深紫外超短パルスレーザーを用いた生体関連分子超高速時間分解振動分光、電気通信大学・東京農工大学 第 7 回合同シンポジウム「ナノ未来材料とコヒーレント光科学」、電気通信大学、平成 22 年 12 月 11 日(土)
- D2. 谷口誠治、CHOSROWJAN Haik、又賀昇、小林孝嘉、Jun Liu、今元泰、sub-10fs 過渡吸収測定による光活性黄色タンパク質(PYP)の光初期異性化ダイナミクス、日本化学会第 90 春季年会(2010)、近畿大学本部キャンパス、平成 22 年 3 月 26 日(金)~29 日(月)
- D3. *小林孝嘉、「フェムト秒パルスコントラストの向上」、平成24年度共同研究成果報告会「レーザー研シンポジウム 2013」、大阪大学銀杏会館、2013 年 5 月 8 日(水)~9 日(木)
- D4. *宮崎 淳 1,2, 鶴井 博理 3, 林(高木) 朗子 4, 河西 春朗 4, 小林 孝嘉 1,2(電通大先端レーザー 1, CREST 2, 順天堂医 3 東大医 4)、「半導体レーザーを用いた超解像誘導放出顕微鏡の開発と生体イメージングへの応用」、2014 年 第 62 回応用物理学会春季学術講演会、青山学院大学相模原キャンパス、2014 年 3 月 17 日(月) ~ 20 日(木)
- D5. 並木佑樹 A, 田中太地 A, 沼田雄大 A, 中川和哉 A, 小林孝嘉 B, 徳永英司 A, C (東理大理 A, 電通大先端レーザー研 B, 東理大グリーン&セーフティ研 C)、「多環共役炭化水素の非共鳴励起エキシマー発光」、日本物理学会第 69 回年次大会、東海大学 湘南

キャンパス、2014年3月27日(木)～3月30日(日) 29pPSA-25

- D6. 田中太地 A, 沼田雄大 A, 磯野巧実 A, 奥田良直 A, 中川和哉 A, 小林孝嘉 B,C,D, 徳永英司 A,C(東理大 A, 電通大先端レーザー研 B, CRESTC, 台湾交通大物理 D)、「ペリレン結晶のエキシマー発光空間分解分光」、日本物理学会第 69 回年次大会、東海大学 湘南キャンパス、2014年3月27日(木)～3月30日(日) 29pPSA-26
- D7. 鈴木優人 A, 大澤健吾 A, 沼田雄大 A, 田中太地 A, 小林孝嘉 B, 徳永英司 A(東理大理 A, 電通大レーザー先端研 B)、「白色光ベクトルビームの発生と分光」、日本物理学会第 69 回年次大会、東海大学 湘南キャンパス、2014年3月27日(木)～3月30日(日)29pPSA-38
- D8. 齋藤順平 A, 伊藤大記 A, 大澤健吾 A, 雪田俊平 A, 中田和明 A, 小林孝嘉 BCD, 徳永英司 ACE(東理大理 A, 電通大先端レーザー研 B, CREST C, 台湾交通大電子物理 D, 東理大グリーン&セーフティ研 E)、「n 型半導体のフェルミ表面電子分布変調分光」、日本物理学会第 69 回年次大会、東海大学 湘南キャンパス、2014年3月27日(木)～3月30日(日) 29pPSA-54
- D9. 伊藤大記 A, 齋藤順平 A, 大澤健吾 A, 雪田俊平 A, 中田和明 A, 小林孝嘉 BCD, 徳永英司 ACE(東理大理 A, 電通大先端レーザー研 B, CREST C, 台湾交通大電子物理 D, 東理大 G&S 研 E)、「単電極の面内電流変調による電気光学効果」、日本物理学会第 69 回年次大会、東海大学 湘南キャンパス、2014年3月27日(木)～3月30日(日)29pPSA-55
- D10. 奥田良直 A, 中田和明 A, 雪田俊平 A, 大澤健吾 A, 小林孝嘉 B,D,E, 徳永英司 A,C,D(東理大理 A, 電通大先端レーザー研 B, 東理大グリーン&セーフティ研 C, CRESTD, 台湾交通大電子物理 E)、「ポリフィリン J 会合体のポッケルス効果」、日本物理学会第 69 回年次大会、東海大学 湘南キャンパス、2014年3月27日(木)～3月30日(日) 29pPSA-61
- D11. 鈴木雅也 A, 中田和明 A, 小林孝嘉 BCD, 徳永英司 AC(東理大理 A, 電通大先端レーザー研 B, CRESTC, 台湾交通大電子物理 D)、「ポルフィリン H 会合体の電場変調分光」、日本物理学会第 69 回年次大会、東海大学 湘南キャンパス、2014年3月27日(木)～3月30日(日) 29pPSA-62
- D12. 雪田俊平 A, 塩川直幸 A, 大澤健吾 A, 小林孝嘉 B, 徳永英司 A, C(東京理科大 A, 電通大 B, 東理大グリーン&セーフティ研 C)、「水・電極界面の状態がバルク水の異常ポッケルス効果に与える影響」、日本物理学会第 69 回年次大会、東海大学 湘南キャンパス、2014年3月27日(木)～3月30日(日)30aCD-1
- D13. 中田和明, 鈴木雅也, 小林孝嘉 A, 徳永英司(東理大理, 電通大先端レーザー研 A)、「ポルフィリン J 会合体の PVP フィルム中における単量体比 10 万倍以上の電気光学効果」、日本物理学会第 69 回年次大会、東海大学 湘南キャンパス、2014年3月27日(木)～3月30日(日)30aCD-2
- D14. *宮崎淳、川角洗史、小林孝嘉、”湯川ポテンシャル散乱型の光熱変換顕微鏡とその超解像性”、日本物理学会秋季第 69 回大会、2014年9月7日(日)～10日(水)
- D15. *塩川直幸、Bing Xue A, 瀬戸啓介 A, Arkadiusz Jarota A, 中田和明、徳永英司、小林孝嘉 ABC(東理大理、電通大先端レーザーA, CRESTB、台湾交通大電子物理 C)、“深紫外 fs 秒 pump-probe 過渡吸収分光によるアミノ酸の振動解析”、日本物理学会秋季第 69 回大会、中部大学(春日井キャンパス)、2014年9月7日(日)～10日(水)
- D16. 中田和明、徳永英司、J. Du AB、B. Xue AB、宮崎淳 AB、瀬戸啓介 AB、小林孝嘉 ABC(東理大理、電通大レーザー研 A, CRESTB、台湾交通大電子物理 C)、“9.4fs パルスレーザーを用いた K-TCNQ 結晶のピエルス相融解による分子内振動周波数の変調”、日本物理学会秋季第 69 回大会、中部大学(春日井キャンパス)、2014年9月7日(日)～10日(水)(参)
- D17. 中田和明、鈴木雅也、小林孝嘉 AB、徳永英司(東理大理、電通大先端レーザー研 A, CREST B)、“電場印加による水溶液中のポルフィリン J 会合体の巨大吸収変化($\Delta A > A/10$)”、日本物理学会秋季第 69 回大会、中部大学(春日井キャンパス)、2014年9月7

日(日)～10日(水)(参)

- D18. 鈴木雅也、中田和明、黒田玲子 A、小林孝嘉 BCD、徳永英司(東理大理、東理大総研機構 A、電通大先端レーザー研 B、CREST C、台湾交通大電子物理 D)、“ポルフィリン H 会合体の電場変調分光Ⅱ”、日本物理学会秋季第 69 回大会、中部大学(春日井キャンパス)、2014 年 9 月 7 日(日)～10 日(水)
- D19. 齋藤順平 A、高木健太郎 A、雪田俊平 A、中田和明 A、島袋竜成 A、出村郷志 A、坂田英明 A、小林孝嘉 B、C、D、徳永英司 A、C、E(東理大理 A、電通大先端レーザー研 B、CREST C、台湾交通大電子物理 D、東理大グリーン&セーフティ研 E)、“銀、金、TaS₂ のフェルミ表面電子分布変調分光”、日本物理学会春季第 70 回年次大会、早稲田大学 早稲田キャンパス、2015 年 3 月 21 日(土)～24 日(火)(参)
- D20. 鈴木優人 A、大澤健吾 A、雪田俊平 A、小林孝嘉 B、徳永英司 A(東理大理 A、電通大先端レーザー研 B、東理大グリーン&セーフティ研 C)、“気液界面の水の異常に巨大なポッケルズ効果”、日本物理学会春季第 70 回年次大会、早稲田大学 早稲田キャンパス、2015 年 3 月 21 日(土)～24 日(火)(参)
- D21. 中田和明、鈴木雅也、小林孝嘉 AB、徳永英司(東理大理、電通大先端レーザー研 A、CREST B)、“ポリマーフィルム中の J、H 会合体電気光学効果の塩酸添加による増大”、日本物理学会春季第 70 回年次大会、早稲田大学 早稲田キャンパス、2015 年 3 月 21 日(土)～24 日(火) (参)
- D22. 田中太地、Bing Xue A、瀬戸啓介 A、Arkadiusz Jarota A、中田和明、徳永英司、小林孝嘉 ABC(東理大理、電通大先端レーザー A、CREST B、台湾交通大電子物理 C)、“3-Hydroxyflavone の深紫外フェムト秒過渡吸収分光”、日本物理学会春季第 70 回年次大会、早稲田大学 早稲田キャンパス、2015 年 3 月 21 日(土)～24 日(火)(参)
- D23. 塩川直幸、Bing Xue A、瀬戸啓介 A、Arkadiusz Jarota A、中田和明、徳永英司(東理大理、電通大先端レーザー A、CREST B、台湾交通大電子物理 C)、“深紫外フェムト秒分光法によるトリプトファンの実時間振動測定と振動モード解析”、日本物理学会春季第 70 回年次大会、早稲田大学 早稲田キャンパス、2015 年 3 月 21 日(土)～24 日(火)
- D24. 両角海里 A、鈴木優人 A、齋藤順平 A、大澤健吾 A、雪田俊平 A、中田和明 A、小林孝嘉 B、徳永英司(東理大理 A、電通大先端レーザー研 B、東理大グリーン&セーフティ研 C)、電極界面平行電流による水の Pockels 効果、日本物理学会春季第 70 回年次大会、早稲田大学 早稲田キャンパス、2015 年 3 月 21 日(土)～24 日(火)(参)
- D25. 白川正之、奥田良直、塩川直幸、中田和明、小林孝嘉 AB、徳永英司(東理大理、電通大先端レーザー A、CREST B)、光誘起力によるポルフィリン分子の会合制御、日本物理学会春季第 70 回年次大会、早稲田大学 早稲田キャンパス、2015 年 3 月 21 日(土)～24 日(火)(参)
- D26. 船津勇輝 A、沼田雄大 A、田中太地 A、中田和明 A、小林孝嘉 BCD、徳永英司(東理大理 A、電通大先端レーザー研 B、CREST C、台湾交通大物理 D、東理大グリーン&セーフティ研 E)、“有機ナノ結晶のパッケージ効果”、日本物理学会春季第 70 回年次大会、早稲田大学 早稲田キャンパス、2015 年 3 月 21 日(土)～24 日(火)(参)
- D27. 鈴木雅也、Bing Xue A、瀬戸啓介 A、Arkadiusz Jarota A、中田和明、徳永英司、小林孝嘉 ABC(東理大理、電通大先端レーザー A、CREST B、台湾交通大電子物理 C)、ポルフィリン会合体、単量体の時間分解吸収分光、日本物理学会春季第 70 回年次大会、早稲田大学 早稲田キャンパス、2015 年 3 月 21 日(土)～24 日(火)
- D28. 鈴木雅也、Bing Xue A、瀬戸啓介 A、Arkadiusz Jarota A、中田和明、徳永英司、小林孝嘉 ABC(東理大理、電通大先端レーザー A、CREST B、台湾交通大電子物理 C)、光誘起力による多環共役炭化水素の非共鳴励起エキシマー発光、日本物理学会春季第 70 回年次大会、早稲田大学 早稲田キャンパス、2015 年 3 月 21 日(土)～24 日(火)(参)
- D29. 並木佑樹、田中太地、沼田雄大、中川和哉、小林孝嘉 A、B、徳永英司、東理大理、電通大先端レーザー A、CREST B、多環共役炭化水素の異常に高効率な非共鳴励起エキシ

- マー発光、日本物理学会 2015 年秋季大会年次大会、18pPSA-69
- D30. 齋藤順平 A、高木健太郎 A、雪田俊平 A、中田和明 C、小林孝嘉 BCD、徳永英司 AC、東理大理 A、電通大先端レーザー研 B、CREST C、台湾交通大電子物理 D、フェルミ表面電流変調分光:ジュール熱の影響の分離、日本物理学会 2015 年秋季大会年次大会、18aCF-2
- D31. 高木健太郎、渡邊良祐 A、齋藤順平、鈴木雅也、Bing Xue C、瀬戸啓介、Selva NairB、小林孝嘉C,D、徳永英司A、東理大理、成蹊理工大A、トロント大 B、電通大先端レーザー研 C、CREST D、
Au、Ag プラズモン励起によるフェルミ海の波立ちを光で見る、日本物理学会 2015 年秋季大会年次大会、18pPSA-75
- D32. 鈴木優人、雪田俊平、小林孝嘉 A、徳永英司、東理大理、電通大先端レーザー研 A、界面平行電場による気水界面のポッケルス効果、日本物理学会 2015 年秋季大会年次大会、18pPSA-33
- D33. 雪田俊平、塩川直幸、鈴木優人、小林孝嘉 A、B、徳永英司、東理大理、電通大量子・物質 A、CREST B、バルク水の異常ポッケルス効果の電極依存性、日本物理学会 2015 年秋季大会年次大会、18aCF-1
- D34. 白川正之、鈴木雅也、塩川直幸、中田和明 C、小林孝嘉 AB、徳永英司、東理大理、電通大先端レーザー研 A、CREST B、電通大 C、非共鳴、非集光レーザーによるポルフィリン分子の異常な会合状態変化、日本物理学会 2015 年秋季大会年次大会、18pPSA-28
- D35. 鈴木雅也 A、奥田良直 A、中田和明 B、小林孝嘉 CDE、徳永英司 A、東理大理 A、電通大 B、電通大先端レーザーC、CRESTD、台湾交通大電子物理 E、J 会合体水溶液の DC 電場誘起ポッケルス効果、18pPSA-34
- D36. 田中太地、沼田雄大、磯野巧実、中川和哉、小林孝嘉 A,B,C、徳永英司、東理大理、電通大先端レーザー研 A、CRESTB、台湾交通大物理 C、「ペリレン分子結晶の十字型発光」、日本物理学会 2015 年秋季大会年次大会、18pPSA-53
- D37. *瀬戸啓介 A、塚田敏秋 B、奥田良直 A、徳永英司 A、小林孝嘉 C、東理大理 A、計測ソ B、CREST、電通大先端レーザーC、「ポンプ・プローブ分光計測に適した位相検波法による強度雑音キャンセリング法」、日本物理学会 2015 年秋季大会年次大会

<国際>

- D1. *J. Miyazaki, Y. Kida, and T. Kobayashi, "Electronic Excited State and Vibrational Dynamics of Water Solution of Cytosine Observed by Time-resolved Transient Absorption Spectroscopy with Sub-10fs Deep Ultraviolet Laser Pulse", XVIII International Conference on Ultrafast Phenomena (UP 2012), Lausanne, Switzerland, Jul. 8-13, 2012
- D2. J. Harra, J. Mäkitalo, R. Siikanen, M. Virkki, G. Genty, T. Kobayashi, M. Kauranen and J.M. Mäkelä, "Plasmonic properties of size-selected spherical silver nanoparticles", European Aerosol Conference (EAC 2012), Granada, Spain, Sep. 2-7, 2012
- D3. *B. Xue, T. Kobayashi, J. Du, Y. Jiang, "Excited state dynamics for thymine by using sub-10 femtosecond deep ultraviolet pump and probe pulses", TRVS2013, Beppu, Japan, May 19-24, 2013
- D4. T. Kobayashi, T. Iiyama, K. Okamura, J. Du, and T. Masuda, "Determination of Huang-Rhys factors of multi-dimensional hyper-potential surfaces obtained by a few-cycle pulse laser", TRVS2013, Beppu, Japan, May 19-24, 2013
- D5. T. Kobayashi., Z. Nie, X. Bing, and J. Du, "Ring breathing mode (RBMs) coupled with exciton in semiconducting single-walled carbon nanotubes", CLEO2014, San Jose Convention Center, San Jose, CA, USA, June 8-13, 2014
- D6. T. Kobayashi, T. Iiyama, K. Okamura, J. Du, and T. Masuda, "Determination of multidimensional hyper potential surface configuration in polyacetylene derivative",

CLEO2014, San Jose Convention Center, San Jose, CA, USA, June 8-13, 2014
D7. *J.-P. He, T. Kobayashi, "18.7-fs DUV pulses generated by using chirped-pulse four-wave mixing in bulk material", CLEO2014, San Jose Convention Center, San Jose, CA, USA, June 8-13, 2014

【広島大チーム】(国内会議 10 件、国際会議 2 件)

<国内>

- H1. 坂本勇哉, 安倍 学, 「拡張型クマリン骨格を有する新規光解離性保護基の合成とその光反応性」、2011 年光化学討論会、宮崎市河畔コンベンションエリア、2011 年 9 月 6-8 日
- H2. 伊藤晋平, 安倍 学「二光子吸収能に及ぼす構造および置換基効果に関する計算化学的研究」、011 年光化学討論会、宮崎市河畔コンベンションエリア、2011 年 9 月 6-8 日
- H3. Sakamoto, Yuya; Huang, Bo; Manabu Abe, Synthesis and Photochemical Reactivity of Novel Coumarin-based Caged Compounds, 2012 年光化学討論会, 東京工業大学大岡山キャンパス, 2012年9月12日
- H4. 吉富翔平・三島 愛・安倍 学, 4,4-ジアロコキシ-1,2-ジアザシクロペンタン-3,5-ジイルジラジカルの発生とその反応性, 学習院大学目白キャンパス, 2013年9月5日
- H5. Synthesis and Photochemical Reactivity of Caged-compounds with Stilbene-based Two-photon Chromophore, 学習院大学目白キャンパス, 2013年9月5日
- H6. 水野武見・藤原好恒・安倍 学, シクロペンタン-1,3-ジラジカル三重項から一重項への項間交差に関する研究, 学習院大学目白キャンパス, 2013 年 9 月 5 日
- H7. 重川泰之・安倍 学, ニトロキシドラジカルを持つシクロペンタン-1,3-ジラジカルの閉環反応に伴うスピン多重度の変化, 学習院大学目白キャンパス, 2013 年 9 月 5 日
- H8. 神代隼輔・安倍 学, 平面環状骨格によるストレッチ効果を利用した開殻系分子の速度論的安定化, 学習院大学目白キャンパス, 2013 年 9 月 6 日
- H9. 金原幸誠・安倍 学, シクロプロパン誘導体からの異常発光現象の解明に関する研究, 愛媛大学城北地区, 2013 年 9 月 11 日
- H10. 澤井麻子・安倍 学, 脱カルボニル反応を用いるジラジカルの発生とその反応挙動に関する研究, 愛媛大学城北地区, 2013 年 9 月 11 日

<国際>

- H1. Shohei Yoshidomi, Manabu Abe, Photochemical Generation of 4,4-Dialkoxy-1,2-diazacyclopentane-3,5-diyls and Their Reactivity, The 10th Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, Seoul, Korea, June 21-23, 2014.
- H2. Kengo Uchihashi, Manabu Abe, A Study on Photochemical [2+2] Cycloaddition of Allylamine Derivative, The international symposium on reactive intermediates and unusual molecules (ISRIUM2014), Hiroshima, Japan, April 1-6, 2014.

【東京大チーム】(国内会議 13 件、国際会議 12 件)

<国内>

- T1. H. Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, H. Kasai & T. Ichiki (2011.9.12) Brain interface device with permeable hydrogel membrane for in vivo analysis of neural cells, 2011 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM2011), Extended Abstracts of the SSDM2011 pp. 1101-1102, (Aichi, Japan) r.
- T2.* 高橋倫子、大野光代、澤田和可子、河西春郎、(2012.3.27). 2光子蛍光寿命画像法による開口放出 SNARE 機構の研究 (Two-photon FRET/FLIM imaging of SNARE dependent exocytosis). 日本生理学会(松本).
- T3. A. Nagaoka, H. Takehara, J. M. Fukuda, Noguchi, T. Akagi, T. Ichiki & H. Kasai (2013.3.27). Long-term *in vivo* imaging of dendritic spines with a

microfluidic device and open-dura surgery in the adult mouse cortex. 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Tokyo).

- T4.* N. Takahashi, W. Sawada, S. Watanabe, M. Ohno & H. Kasai (2013.3.27). Two-photon FRET/FLIM imaging of SNARE-dependent exocytosis. 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Tokyo).
- T5.* S. Yagishita, A. Hayashi-Takagi, S. Watanabe & H. Kasai (2013.6.21). A narrow time window for dopaminergic enhancement of spine structural plasticity in nucleus accumbens, Neuro2013 (Kyoto).
- T6.* 柳下 祥、林(高木)朗子、渡邊恵、河西春郎 (2014.3.16). ドーパミンによる側坐核スパイン形態可塑性の鋭い時間枠での調節とその分子機構. 第91回日本生理学会大会(鹿児島).
- T7.* 澤田和可子、高橋倫子、渡邊恵、大野光代、河西春郎 (2014.3.17). シナプス前終末における開口放出関連蛋白 SNAP25 の構造と機能. 第91回日本生理学会大会(鹿児島).
- T8.* 渡邊 恵、高橋倫子、野口潤、河西春郎 (2014.3.17). 樹状突起スパイン頭部増大によるシナプス前終末の速い機械的調節. 第91回日本生理学会大会(鹿児島).
- T9.* 高橋倫子、澤田和可子、渡邊恵、大野光代、河西春郎 (2014.3.18). 内分泌細胞と神経細胞における SNARE 複合化の2光子 FLIM 解析. 第91回日本生理学会大会(鹿児島).
- T10.* J. Noguchi, Satoshi, W, Noriko, T. & H. Kasai (2014.9.11) Presynaptic probe for reporting synaptic plasticity in hippocampal cultured slices, Neuro2014 (横浜).
- T11.* S.Yagishita, A.Hayashi-Takagi, G.C.R. Ellis-Davies, H.Urakubo, S.Ishii, and H. Kasai (2014.12.6) A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines, "Vision, Memory, Thought: How Cognition Emerges from Neural Network" (東京).
- T12. A. Nagaoka, H. Takehara, J. M. Fukuda, Noguchi, T. Akagi, T. Ichiki & H. Kasai (2013.3.27). Long-term *in vivo* imaging of dendritic spines with a microfluidic device and open-dura surgery in the adult mouse cortex. 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Tokyo).
- T13. A. Nagaoka, H. Takehara, A. Hayashi-Takagi, J. Noguchi, K. Ishii, F. Shirai, S. Yagishita, T. Akagi, T. Ichiki, and H. Kasai. (2015.6.21) Abnormal intrinsic dynamics of dendritic spines in fragile-X mice model revealed by microfluidic device *in vivo*. 第15回東京大学生命科学シンポジウム(東京).

<国際>

- T1. H. Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, H. Kasai & T. Ichiki (2010.10.14), Microfluidic interface devices for *in vivo* analysis of neural cells using 2-photon laser scanning microscopy, The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro-TAS2010), Proceedings of \square TAS 2010 Conference pp. 2111-2113, (Groningen, Netherlands).
- T2.* Tatsuya Hayama, Yuya Kanemoto, Masanori Matsuzaki, Graham C.R. Ellis-Davies & Haruo Kasai (2010.11.17) GABA dependence of locally competitive learning rules of dendritic spines revealed by two-color uncaging of glutamate and

GABA. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA), Abstract 239.23.

- T3.* Kanemoto Y, Morita S, Matsuzaki M, Momotake A and Kasai H (2011.7.4). Spatial Distributions of GABA receptors and local inhibition of Ca²⁺ transients studied with GABA uncaging in the dendrites of CA1 pyramidal neurons. IBRO 8th World Congress of Neuroscience (Florence, Italy).
- T4. H. Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, T. Sakai, U. Chung, H. Kasai and T. Ichiki,(2011.10.21). Hydrogel reactive microbonding method for the use of Tetra-PEG gel as a structural material for microfluidic devices, The 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro-TAS2011), Proceedings of □TAS 2011 Conference pp. 449-451, (Seattle USA).
- T5. H. Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, H. Kasai & T. Ichiki (2011. 9.12). Implantable microfluidic devices for neuroscience, 6th Biyani's International Conference-2011 (BICON-11), (Jaipur, India).
- T6. H. Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, H. Kasai & T. Ichiki (2012.10.18). Implantable microfluidic interface devices with drug perfusion function through hydrogel membrane, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro-TAS2012), (Okinawa, Japan).
- T7. H. Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, T. Sakai, U. Chung, H. Kasai & T. Ichiki (2012.10.27), Tetra-PEG Gel/PDMS Hybrid Microfluidic Devices for In Vivo Analysis of Neural Cells, 9th International Gel Symposium (Gelsympo2012), (Tsukuba, Japan).
- T8.* T. Hayama, J. Noguchi, S. Watanabe, N. Takahashi, A. Hayashi-Takagi, G. C. R. Ellis-Davies, M. Matsuzaki & H. Kasai (2012.10.13). The molecular basis of local synaptic competition between dendritic spines. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA), Abstract 44.27.
- T9. A. Nagaoka, H. Takehara, J. Noguchi, T. Akagi, T. Ichiki & H. Kasai (2012.10.14). Chronic *in vivo* imaging of dendritic spines with a microfluidic device and open-dura surgery in the adult mouse cortex. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA), Abstract 239.23.
- T10.* N. Takahashi, M. Ohno, S. Watanabe, W. Sawada & H. Kasai (2012.10.15). Two-photon FRET/FLIM imaging of SNARE-dependent exocytosis. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA), Abstract 337.18.
- T11. M. Fukuda, H. Ohno, T. Okada, S. Takeda & H. Kasai (2012.10.15). Structural plasticity of dendritic spines in primary visual cortex during behavioral tasks. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA), Abstract 337.18.
- T12.* H. Kasai & N. Takahashi (2014.8.5) FRET/FLIM analysis of SNARE structure and function in presynaptic terminals. Gordon Research Conference on Synaptic Transmission (New Heaven, USA).

(4)知財出願

【電通大チーム】

①国内出願 (9 件)

- Dd1.*光学測定装置及び光学測定方法、小林 孝嘉・瀬戸 啓介、
国立大学法人電気通信大学、2013/06/27、特願 2013-135412
- Dd2.*光学測定装置、光学測定方法、及び顕微イメージングシステム、
宮崎 淳・小林 孝嘉、国立大学法人電気通信大学、2013/08/30、
特願 2013-178953
- Dd3.*光信号検出装置、塚田 敏・瀬戸 啓介・小林 孝嘉・塚田 敏秋、
国立大学法人電気通信大学、2013/09/24、特願 2013-196504
- Dd4.*ケージド化合物及びその製造方法、安倍 学・河西 春郎・小林 孝嘉、
国立大学法人広島大学・国立大学法人電気通信大学、2013/12/26、
特願 2013-269107
- Dd5.*光学測定装置、光学測定方法、及び顕微イメージングシステム、
宮崎 淳・小林 孝嘉・川角 洸史、国立大学法人電気通信大学、2014/06/24、
特願 2014-128920
- Dd6.*光学測定装置および光学測定方法、塚田 敏秋・瀬戸 啓介・小林 孝嘉、
塚田 敏秋・国立大学法人電気通信大学、2014/09/19、特願 2014-191427
- Dd7.*光学測定装置及び光学測定方法、小林 孝嘉・王 楠・宮崎 淳、
国立大学法人電気通信大学、2014/08/05、特願 2014-159837
- Dd8.*光学測定装置及び光学測定方法、宮崎 淳・小林 孝嘉、
国立大学法人電気通信大学、2015/01/09、特願 2015-003066

②海外出願 (3 件)

- Df1.*光学測定装置及び光学測定方法、小林 孝嘉・瀬戸 啓介、
国立大学法人電気通信大学、2014/06/12、PCT/JP2014/065587、
PCT(全指定国)
- Df2.*光学測定装置、光学測定方法、及び顕微イメージングシステム、
宮崎 淳・小林 孝嘉・川角洸史、国立大学法人電気通信大学、2014/08/29、
PCT/JP2014/072810、PCT(全指定国)
- Df3.*光学測定装置および光学測定方法、塚田 敏秋・瀬戸 啓介・小林 孝嘉、
国立大学法人電気通信大学、2014/09/19、PCT/JP2014/074890、
PCT(日本を除く全指定国)

【広島大チーム】

①国内出願(1 件)

- Hd1=Dd4.*ケージド化合物及びその製造方法、安倍 学・河西 春郎・小林 孝嘉、国立大学法
人広島大学・国立大学法人電気通信大学、2013/12/26、
特願 2013-269107

【東京大チーム】

①国内出願(1 件)

- Td1.*シナプス増強を可視化するプローブ、林(高木)朗子、河西春郎、
国立大学法人東京大学、2014/6/11、特願2014-120841

(5)受賞・報道等

①受賞

【電通大チーム】

D1. * 2010 年 フンボルト賞 (Humboldt Research Award) (Humboldt Foundation)

D2. * 日本化学会賞、小林孝嘉、平成 24 年 3 月 26 日

D3. * 日本化学会フェロー、小林孝嘉、平成 25 年 3 月 23 日

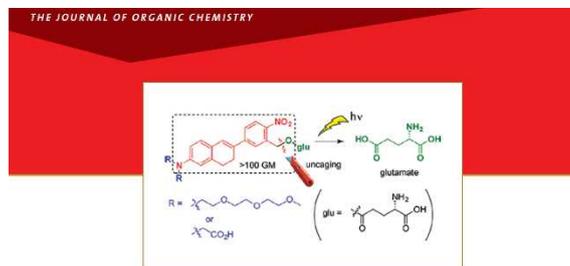
D4. * 米国光学会 (The Optical Society: OSA) シニアメンバー選任、小林孝嘉、平成 27 年 5 月 11 日

D5. * レーザー学会フェロー、小林孝嘉、平成 27 年 5 月 29 日

【広島大チーム】

H1. * 本研究(H22)は、2014 年にアメリカ化学会誌、The Journal of Organic Chemistry の Featured Article に選出

Caged Glutamates with π -Extended 1, 2-Dihydronaphthalene Chromophore: Design, Synthesis, Two-Photon Absorption Property, and Photochemical Reactivity. Boinapally, Srikanth; Huang, Bo; Abe, Manabu*; Katan, Claudine*; Noguchi, Megumi; Watanabe, Satoshi; Kasai, Haruo; Bing Xue, Kobayashi, Takayoshi. J. Org. Chem., 2014, 79, 7822-7830



Caged Glutamates with π -Extended 1,2-Dihydronaphthalene Chromophore: Design, Synthesis, Two-Photon Absorption Property, and Photochemical Reactivity

AUTHORS: Srikanth Boinapally, Bo Huang, Manabu Abe,* Claudine Katan,* Jun Noguchi, Satoshi Watanabe, Haruo Kasai, Bing Xue, and Takayoshi Kobayashi

10.1021/jo501425p, 2014, 79 (17), pp 7822–7830

ABSTRACT: Caging and photochemical uncaging of the excitatory neurotransmitter L-glutamate (glu) offers a potentially valuable tool for understanding the mechanisms of neuronal processes. Designing water-soluble caged glutamates with the appropriate two-photon absorption property is an attractive strategy to achieve this. This paper describes the design, synthesis, and photochemical reactivity of caged glutamates with π -extended 1,2-dihydronaphthalene structures, which possess a two-photon cross-section of ~ 120 GM and an excellent buffer solubility (up to 115 mM). High yields up to 99% glutamate were observed in the photolysis of two caged glutamates. Suzuki–Miyaura cross-coupling and Buchwald–Hartwig amination were used as the key reactions to synthesize the caged compounds.



MANABU ABE'S BIO

Dr. Manabu Abe was born in Sakai City, Osaka Prefecture, Japan. He received his Ph.D. in 1995 from the Kyoto Institute of Technology under Prof. Akira Oku, studying the oxidative ring-opening reaction of cyclopropanone acetals and its application to organic synthesis. In 1995, he joined the faculty at Osaka University (Prof. Masatomo Nijima's group). From 1997 to 1998, he was an Alexander von Humboldt fellow with Prof. Waldemar Adam at the Universität Würzburg in Germany. He was also a visiting researcher at the Ludwig Maximilian University München (with Prof. Herbert Mayr) in 2007. Dr. Abe moved to Hiroshima and became a full professor in Organic Chemistry at the Department of Chemistry, Graduate School of Science, Hiroshima University in 2007. His research focuses on reactive intermediates chemistry, especially diradical, organic photochemistry, and unusual molecules.

本研究が米国化学会誌紹介された記事

【東京大チーム】

T-1. * 平成 22 年度 上原賞(上原記念生命科学財団)

②マスコミ(新聞・TV等)報道

【電通大チーム】

D1. * 2014 年 5 月 19 日 朝日新聞デジタルポンプ・プローブ分光顕微鏡 コスト 1/50 で製作
小林孝嘉特任教授と宮崎淳特任助教 (先端超高速レーザー研究センター) が安価な半導体

レーザーでポンプ・プローブ分光顕微鏡を作る技術を開発。

電気通信大学の小林孝嘉教授と宮崎淳特任助教は、安価な半導体レーザーでポンプ・プローブ分光顕微鏡を作る技術を開発した。超短パルスレーザーを光源に使う従来の顕微鏡の50分の1以下のコストで製作できる。生体試料やナノ材料の構造や機能の分析が可能。研究室での原理実証に成功し、企業との共同開発、製品化の段階に進んでおり、早ければ2年内の実用化を目指す。2014年5月19日 朝日新聞デジタル

電気通信大、ポンプ・プローブ光学顕微鏡開発、超解像で高感度

2014/05/22 化学工業日報 10 ページ 670 文字

電通大、コスト 50 分の 1 でポンプ・プローブ分光顕微鏡を製作—半導体レーザー使用

2014/05/19 日刊工業新聞 18 ページ 589 文字

- D2. *2015年3月12日 日経産業新聞 レーザー顕微鏡 100 ナノメートルの解像度
小林孝嘉特任教授(先端超高速レーザー研究センター)らが生物の細胞や組織を 100 ナノメートルの解像度でカラーで観察出来るレーザー顕微鏡を開発。レーザー光が従来よりも弱く、細胞が壊れず生きたまま長時間観察が可能(本紙より)

レーザー顕微鏡、100 ナノメートルの解像度、電通大、カラーで観察、細胞壊れず生きたまま、光2つ当て屈折率利用。

2015/03/12 日経産業新聞 10 ページ 810 文字(日経テレコンより)

レーザー顕微鏡、100 ナノメートルの解像度 電通大、カラーで観察

2015/03/12 07:01 日経速報ニュースアーカイブ 777 文字

- D3. *2015年3月19日 日刊工業新聞 レーザー蛍光顕微鏡 蛍光発しない分子も観察
小林孝嘉特任教授(先端超高速レーザー研究センター)と宮崎淳特任助教(先端超高速レーザー研究センター)らは、蛍光を発しない分子も観察できるレーザー蛍光顕微鏡を開発。早ければ2年内の実用化を目指す。
電通大、蛍光発しない分子も観察できるレーザー蛍光顕微鏡を開発—熱屈折率変化を観察
2015/03/18 日刊工業新聞 24 ページ 663 文字
- D4. *2015年3月30日、31日 【メディアリリース】「新しい電子工学を拓くスピントロニクス材料の高速性能の超高速性能を初めての全時間測定」および「世界最短パルスレーザーを用いた太陽電池材料の性能の新評価法」の研究成果記者会見

- D5. *2015年3月26日 毎日新聞

解像度倍のレーザー顕微鏡

2015/03/26 毎日新聞 朝刊 13 ページ 344 文字

- D6. *2015年3月26日 OPTRONICS - WEB ジャーナル

電通大ら、スピントロニクス材料 MoS₂ の全時間測定に成功 WEB ジャーナル OPTRONICS_0326_2015

”電通大ら、スピントロニクス材料 MoS₂ の全時間測定に成功”

小林孝嘉特任教授(先端超高速レーザー研究センター)らと台湾国立交通大学の研究グループは共同で、スピントロニクス材料として注目を浴びている層状物質 MoS₂ について、スピン・バレー結合およびスピン分極、バレー分布密度、励起子密度全ての緩和過程を明らかにすることに成功

【2015年3月26日 OPTRONICS ONLINE】

- D7. *2015年3月26日 OPTRONICS - WEB ジャーナル

電通大ら、超短パルスレーザーで有機材料の処理過程での性能評価に成功 WEB ジャーナル OPTRONICS_0326_2015

”電通大ら、超短パルスレーザーで有機材料の処理過程での性能評価に成功”

小林孝嘉特任教授(先端超高速レーザー研究センター)らと台湾国立交通大学の研究グループは、太陽電池材料のひとつとして期待されている、有機化合物の製作過程における材料の処理過程の性能評価を行うことに成功

【2015年3月26日 OPTRONICS ONLINE】

D8. *2015年3月26日 日本経済新聞

”細胞壊さず解像度 100 ナノメートル、レーザー顕微鏡”

小林孝嘉特任教授(先端超高速レーザー研究センター)らが、100 ナノメートルの解像度でカラーで観察できるレーザー顕微鏡を開発。細胞や組織が傷つきにくく生きたまま長時間観察が可能に

【2015年3月26日 日本経済新聞ほか】

D9. 2015年4月2日 化学工業日報

有機薄膜 PV 材料 起電力過程を解析 電通大など パルスレーザー使用

電気通信大など、有機薄膜太陽電池材料の起電力過程を解析

2015/04/02 化学工業日報 4 ページ 622 文字

D10. 2015年4月10日 科学新聞

世界最短パルスレーザーで太陽電池材料の性能を評価

電通大などの研究グループ成功

判定時間短縮・経費削減へ期待

小林孝嘉特任教授(先端超高速レーザー研究センター)らのグループは、台湾国立交通大学の盧志偉教授、藪下篤史准教授らのグループと共同で、世界最短パルスレーザーを用いて、太陽電池材料として有望な有機化合物の製作過程における材料の処理過程の性能評価に成功。判定時間短縮・経費削減へ期待

2015/04/10 科学新聞 4 ページ 1208 文字

D11. *2015年5月3日 TBS テレビ

宮崎淳特任助教(先端超高速レーザー研究センター)らが開発した、2つのレーザーを使用して光を発しない分子でも観察可能なレーザー顕微鏡を紹介

【番組】TBS テレビ「未来の起源～若き研究者たちの挑戦～」

【日時】2015年5月3日(日・祝)22:54～

【東京大チーム】

T1. *2013年8月26日 日刊工業新聞

「東京大、脳内メカニズム解明ー記憶の選別に GABA が関与」

2013年8月28日 マイナビニュース

「東京大、抑制伝達物質による脳内のシナプスを整理する仕組みを解明」

プレスリリース概要

大脳の神経結合部位(シナプス)の整理や消去には興奮性伝達物質グルタミン酸とともに、抑制性伝達物質 GABA が必要であることがわかった。2色のレーザーで大脳の神経細胞の単一スパイン(シナプスを構成する棘状の突起)に興奮と抑制の両方の刺激を加えることにより、スパインの収縮を誘発することに成功し、スパインの収縮は周囲のスパインにも広がりシナプスが整理されることを見いだした。抑制性伝達物質 GABA は脳の発達、学習記憶、睡眠、自閉症や統合失調症などの精神疾患に深く関係している。今回の研究は、これらの現象や疾患に新しい展望をもたらす。

T2. *2014年9月29日 財経新聞

「東大、ドーパミンの報酬作用機構を解明 依存症などの治療法開発に期待」

2014年10月3日 ハフィントンポスト

「『パブロフの犬』の脳内の仕組み解明」

快楽中枢である側坐核の神経細胞において、グルタミン酸によるシナプスの活性化とドーパミン刺激を独立に制御し、シナプス可塑性におけるドーパミンの作用を解明した。ドーパミンの報酬作用は、スパインが活性化された直後 2 秒以内の狭い時間枠でのみ、その働きを持つことが明らかとなった。報酬作用の神経基盤を明らかにした本成果は、依存症や強迫性障害などの精神疾患の理解・治療に新しい展望をもたらすと

考えられる。

T3. *2015年9月9日 Online, Nature, News and Views, “Forgetfulness illuminated”

*2015年9月10日 日本経済新聞「脳内に記憶の保管庫 — 東大消去実験にも成功」

*2015年9月10日 毎日新聞朝刊「記憶蓄える神経部位 見えた！ — 東大マウス実験 人為的消去に成功」

神経細胞上の樹状突起スパインが学習・記憶に伴い増大することに着目し、新生・増大スパインを特異的に標識し、青色光でそのスパインを収縮させる事が可能な蛋白質プローブ（記憶プローブ）をマウスで開発しました。運動野を記憶プローブで標識後に青色光を照射すると、運動学習で獲得された記憶が特異的に消去され、記憶は脳内の少数の神経細胞に密に書き込まれていることが明らかになりました。こうして記憶に関わるスパインの脳内の大域的な分布を標識する可能性が拓かれ、脳機能やその疾患の解明に新しい糸口が開かれました。

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開 なし

②社会還元的な展開活動

D1.

新潟県立柏崎高等学校 SSH(スーパーサイエンスハイスクール)講演会における依頼講演
平成 22 年 9 月 3 日

出身高校である新潟県立柏崎高校からの依頼により、高校生対象の講演会をおこなった。

柏崎高校は 2008 年度からSSH(スーパーサイエンスハイスクール)指定を受けており、生徒に科学への興味を喚起するとともに最先端の科学的成果に触れてもらう目的で今回企画されたものである。レーザーの話に限らず広く科学に関する話題を提供した。また講演会后、同校の先生方との交流をおこなった。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

柏崎高校で授業を行った。

H22 年度 なし

H23 年度

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2011 年 4 月 11 日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	21 人	研究打ち合わせ
2011 年 8 月 1 日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	10 人	研究進捗報告のためのミーティング
2011 年 10 月 17 日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	3 人	研究進捗報告のためのミーティング
2011 年 10 月 19 日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	3 人	研究進捗報告のためのミーティング

H24 年度

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2012年 5月26日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	10人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年 6月12日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	12人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年 7月28日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	10人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年 10月9日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	12人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年 10月22日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	10人	研究進捗報告のためのミーティング

H25年度

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2013年 4月11日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	10人	研究進捗報告のためのミーティング
2013年 6月1日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	12人	〃
2013年 6月25日	サイトビジット (非公開)	電気通信大学	12人	サイトビジット
2013年 11月19日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	10人	研究進捗報告のためのミーティング
2014年 2月1日	講演会 (非公開)	電気通信大学	12人	研究関連の講演開催
2014年 2月22日	講演会 (非公開)	電気通信大学	12人	〃

H26年度

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2014年 8月26日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	10人	研究進捗報告のためのミーティング
2014年 10月15日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	10人	研究進捗報告のためのミーティング
2015年 2月12日	サイトビジット (非公開)	電気通信大学	12人	サイトビジット

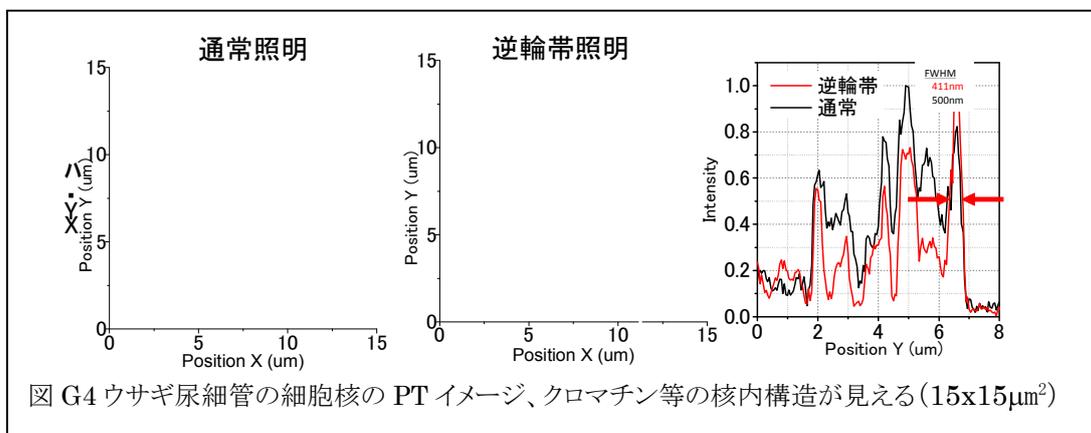
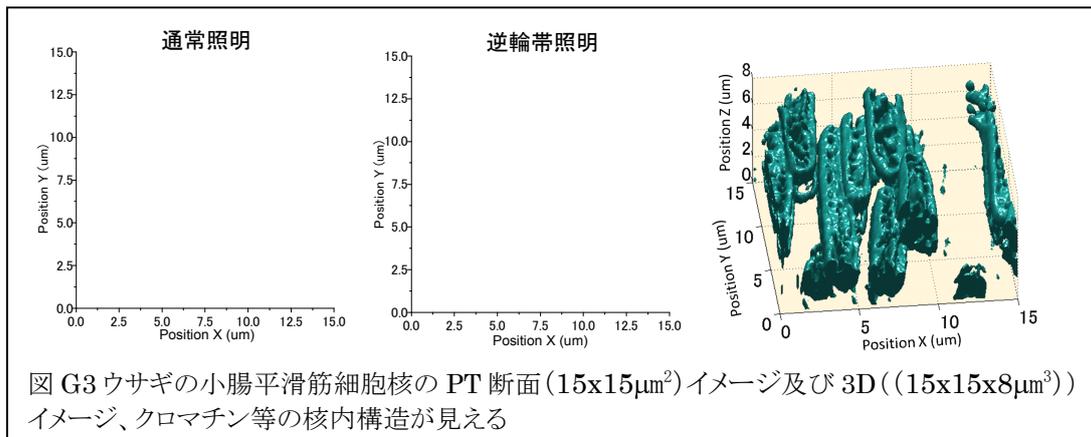
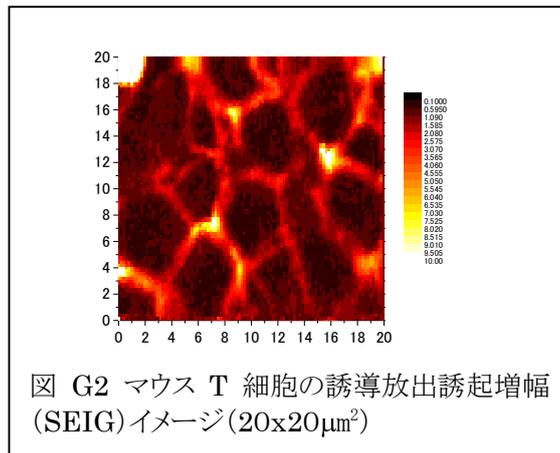
H27年度

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2015年 7月7日	チーム内ミーティング(非公開)	電気通信大学	10人	研究進捗報告のためのミーティング

§ 6 最後に

本文説明中に、イメージングの実験結果はスペースの関係から限られているので載せられなかったデータがたくさん有る。研究過程で得られた超解像イメージを **Image gallery** として載せる。(PT イメージ法は極めて高感度でほぼ光ダメージ無しに3D 像を撮る事が出来る。)

Image gallery



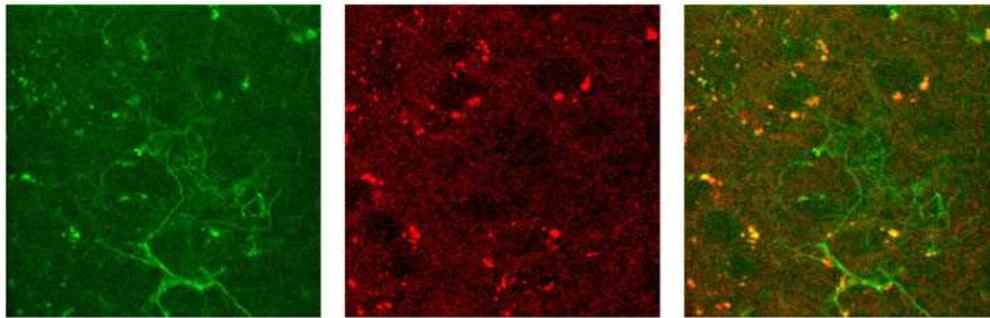


図 G5 マウス脳の海馬領域のアストログリア染色用 GFAP 抗体 Alexa488 染色した試料の同時マルチモーダルイメージ: (左)アストログリアの蛍光イメージ、(中)マイクログリア、オリゴデンドロサイト及び顆粒の PT イメージ、(右)蛍光 PT 重畳イメージ(70x70 μm^2)

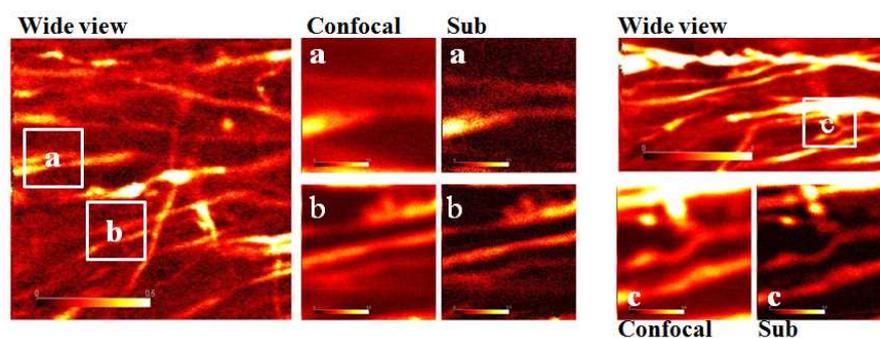


図 G6 マウス脳の同時差引法による超解像イメージ(左)20x20 μm^2 (中、右下) 4x4 μm^2

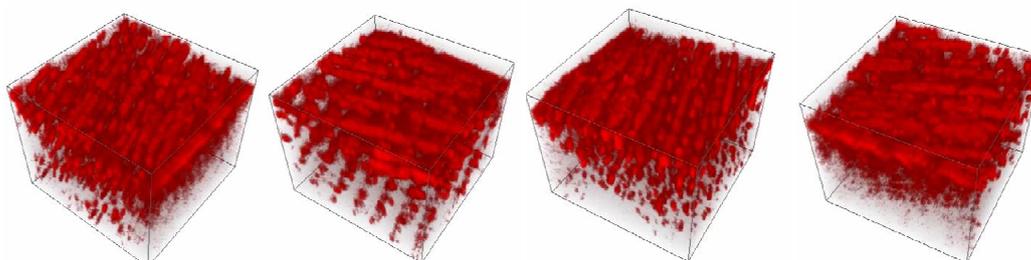


図 G7 生きたラット骨格筋中のミトコンドリアの無標識3次元イメージ、異った方向からのイメージ(20x20x10 μm^3)