

ANALYTICAL CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) “Multimodal and multiplex spectral imaging of rat cornea *ex vivo* using a white-light laser source”

We applied our multimodal nonlinear spectral imaging microscope to the measurement of rat cornea. We successfully obtained multiple nonlinear signals of coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS), third-order sum frequency generation (TSFG), and second harmonic generation (SHG). Depending on the nonlinear optical processes, the cornea tissue was visualized with different image contrast mechanism simultaneously (Fig. 1). Due to white-light laser excitation, multiplex CARS and TSFG spectra were obtained. Combined multimodal and spectral analysis clearly elucidated the layered structure of rat cornea with molecular structural information. This study indicates that our multimodal nonlinear spectral microscope is a promising bioimaging method for tissue study.

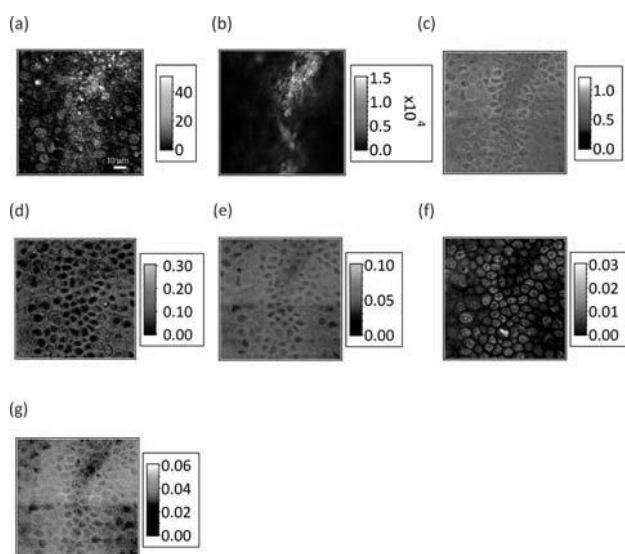


Fig. 1 Multimodal and multiplex spectral imaging of corneal epithelium in the in-plane (XY) direction; (a) TSFG, (b) SHG, (c) CARS at CH₃ stretch, (d) CARS at CH₂ stretch, (e) CARS at CH bend, (f) CARS at purine-ring stretch, (g) CARS at phenylalanine residues. The image corresponds to 100 × 100 μm².

1.(1)-1) *J. Biophotonics*, **8**, 705–713 (2014)

(2) “Electronically resonant third-order sum frequency generation spectroscopy using a nanosecond white-light supercontinuum”

Third-order sum frequency generation (TSFG) is one of the third-order nonlinear optical processes, and has the generation mechanism analogous to third harmonic generation (THG). By using a white-light supercontinuum, we can obtain broadband multiplex TSFG spectra. In the present study, we developed an electronically resonant TSFG spectrometer, and applied it to obtain TSFG spectra of hemoproteins. Analyzed TSFG ratio spectra clearly showed the resonant enhancement attributable to the electronic state of hemoproteins. This is a promising method for the imaging of electronic states of molecules inside living cells or tissues.

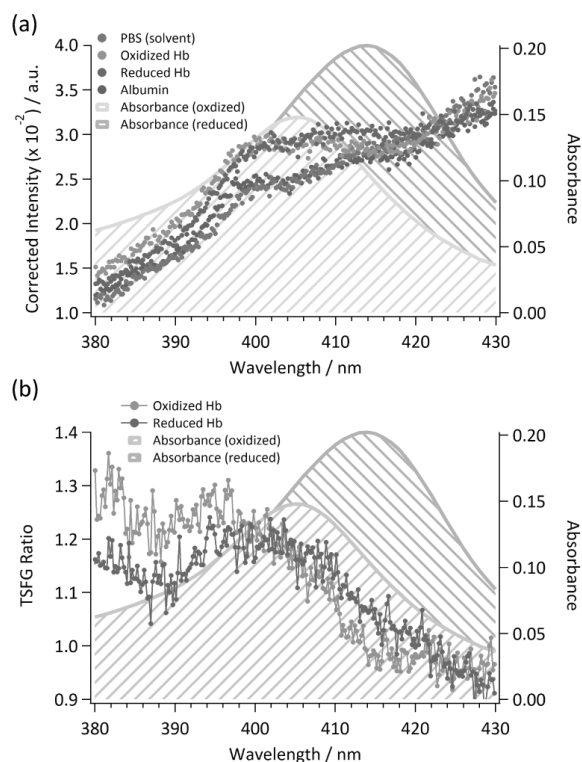


Fig. 2 (a) Intensity-corrected TSFG spectra of Hb solutions. Each plot corresponds to PBS, oxidized Hb, reduced Hb and albumin. For comparison, absorption spectra of oxidized and reduced Hb solutions are shown by solid lines. (b) Calculated ratio spectra of oxidized and reduced Hb solutions.

1.(1)-4) *Opt. Express*, **22**, 10416-10429 (2014)

分析化学研究室

研究ハイライト

(1) 白色レーザー光源を用いたラットの角膜の *ex vivo* マルチモード・マルチプレックススペクトルイメージング

これまでに開発したマルチモード非線形スペクトルイメージング顕微鏡をラット角膜の測定に応用し、コヒーレントアンチストークス散乱 (CARS)、第三次和周波発生 (TSFG) および、第二次高調波発生 (SHG) に由来する非線形信号の同時観測に成功した。各々の非線形光学過程の発生機構の違いに起因し、用いた信号光の種類に応じて異なるイメージコントラストを有する角膜画像が得られた (図1)。また、白色レーザー光源を利用することで、画像計測だけでなく、CARS および TSFG スペクトルの同時取得を実現した。複数の光学過程の画像・スペクトル情報を同時に解析することにより、ラット角膜の層状構造を明らかにし、それに関与する分子の分子構造に関する知見を得た。当研究は我々が開発したマルチモード非線形スペクトル顕微鏡が生体組織のバイオイメージング研究に有望な手法であることを示すものである。

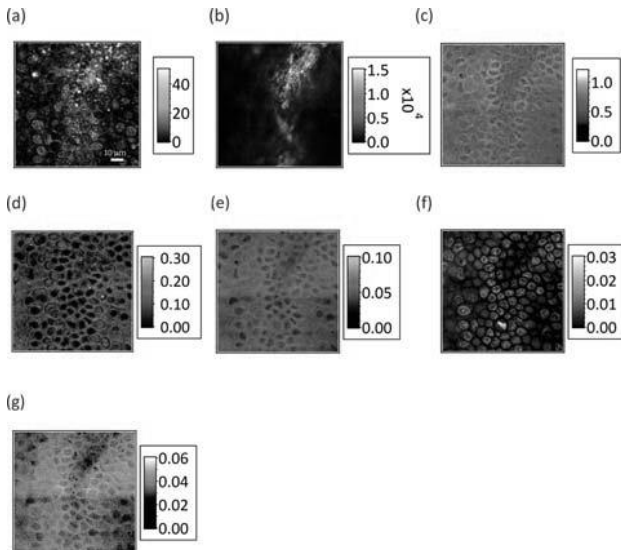


図1 XY 平面での角膜表面のマルチモード・マルチプレックススペクトルイメージング (a) TSFG, (b) SHG, (c) CARS (CH₃ 伸縮振動), (d) CARS (CH₂ 伸縮振動), (e) CARS (CH 変角振動), (f) CARS (プリン環伸縮振動), (g) CARS (フェニルアラニン残基) に由来する信号

1.(1)-1) *J. Biophotonics*, **8**, 705–713 (2014)

(2) ナノ秒白色スーパーコンティニュームによる電子共鳴第三次和周波発生分光法

第三次和周波発生 (TSFG) は第三次高調波発生 (THG) と類似した発生過程を持つ三次非線形光学過程の一つである。白色スーパーコンティニュームを使うことにより、広帯域マルチプレックス TSFG が可能である。本研究では、白色スーパーコンティニュームを利用した電子共鳴 TSFG 分光計の開発と、それを用いたヘムタンパクの TSFG スペクトル観測を行った (図2)。取得した TSFG スペクトルの解析により、ヘムタンパクの電子共鳴が確かに TSFG 信号を増強していることを明らかにした。本結果により、TSFG 信号が生細胞や生体組織を対象とした新たな電子分光 (Electronic spectroscopy) 画像計測手段となりうることを示された。

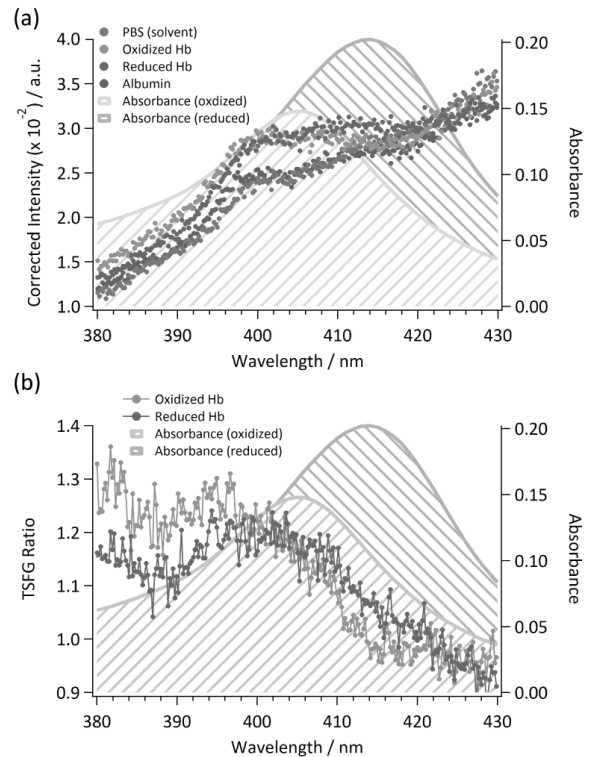


図2 (a) PBS, 酸化型 Hb, 還元型 Hb およびアルブミン蛋白の強度較正済み TSFG スペクトル。比較のため、酸化および還元状態の Hb 吸収スペクトルを実線で示す。(b) 酸化型および還元型 Hb の TSFG 比スペクトル。

1.(1)-4) *Opt. Express*, **22**, 10416-10429 (2014)

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) H. Segawa, Y. Kaji, P. Leproux, V. Couderc, T. Ozawa, T. Oshika, and H. Kano, “Multimodal and multiplex spectral imaging of rat cornea ex vivo using a white-light laser source”, *J. Biophotonics*, **8**, 705–713 (2014).
- 2) S. Haga, T. Ozawa, Y. Yamada, N. Morita, I. Nagashima, H. Inoue, Y. Inaba, N. Noda, R. Abe, K. Umezawa, M. Ozaki, “p62/SQSTM1 plays a protective role in oxidative injury of steatotic liver in a mouse hepatectomy model”, *Antioxid. Redox Signal*, **21**, 2515-2530 (2014).
- 3) S. Hoyng, S. Gnani, F. Winter, R. Eggers, T. Ozawa, A. Zaldumbide, R. Hoeben, M. Malessy, and J. Verhaagen, “Developing a potentially immunologically-inert tetracycline regulatable viral vector for gene therapy in the peripheral nerve”, *Gene Therapy*, **21**, 549-557 (2014).
- 4) H. Segawa, N. Fukutake, P. Leproux, V. Couderc, T. Ozawa, and H. Kano, “Electronically resonant third-order sum frequency generation spectroscopy using a nanosecond white-light supercontinuum”, *Opt. Express*, **22**, 10416-10429 (2014).
- 5) K. Imamura, N. Imamachi, G. Akizuki, M. Kumakura, A. Kawaguchi, K. Nagata, A. Kato, Y. Kawaguchi, H. Sato, M. Yoneda, C. Kai, T. Yada, Y. Suzuki, T. Yamada, T. Ozawa, K. Kaneki, T. Inoue, M. Kobayashi, T. Kodama, Y. Wada, K. Sekimizu, N. Akimitsu, “Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation between nuclear body paraspeckle and promoter mediates IL8 expression in response to immune stimuli”, *Mol. Cell*, **53**, 393-406 (2014).
- 6) M. Hirohama, A.R. Voet, T. Ozawa, H. Saitoh, Y. Nakao, K.Y. Zhang, A. Ito and M. Yoshida, “Assay methods for SUMO-SIM interactions in vivo and in vitro using a split-luciferase complementation system”, *Anal. Biochem*, **448**, 92-94 (2014).

2. 総説・解説

- 1) H. Yoshimura and T. Ozawa, “Methods of split-reporter reconstitution for the analysis of biomolecules”, *Chem. Rec.*, **14**, 492-501 (2014).
- 2) M. Hattori and T. Ozawa, “Split Luciferase Complementation for Analysis of Intracellular Signaling”, *Anal. Sci.*, **30**, 539-543 (2014).

3. 著書

「GPCR に作用する化合物のスクリーニング」服部満, 田中みほ, 小澤岳昌, *Clinical Neuroscience*, 中外医学社, 32(2), p128-129 (2014).