近赤外超短パルス光を用いた細胞内ナノサージェリー

渡辺 歴¹, 松永 幸大², 福井 希一², 伊東 一良²

¹産業技術総合研究所 光技術研究部門 (〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31)

²大阪大学大学院 工学研究科 生命先端工学専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

Intracellular Nanosurgery Using Near-Infrared Ultrashort Laser Pulses

Wataru WATANABE,¹ Sachihito MATSUNAGA,² Kiichi FUKUI² and Kazuyoshi ITOH²

¹Photonics Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,
1-8-31 Midorigaoka, Ikeda, Osaka 563-8577

²Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

(Received January 15, 2007)

Femtosecond laser pulses in the near-infrared region can be used to selectively disrupt and dissect intracellular organelles. We review intracellular surgery of organelles in living cells using a femtosecond laser. We demonstrate surgery of mitochondria in living HeLa cells in vitro using an amplifier with a repetition rate of 1 kHz and only a femtosecond laser oscillator with a repetition rate of 76 MHz. The viability of the cells after disruption of a single mitochondrion was confirmed by the observation of cell division, indicating that intracellular disruption of organelles using a femtosecond laser can be performed without compromising the long-term cell viability. Femtosecond laser-based nanosurgery has the possibility to provide space-selective information on the function and dynamics of organelles in living cells.

Key Words: Nanosurgery, Nonlinear optics, Ultrashort laser, Cell, Organelle

1. はじめに

生命あるものはさまざまな細胞の集まりである。細胞は、栄養を取り入れたり、動いたり、刺激に反応したりしながら、成長、分裂を繰り返し、生きており、この細胞の中には細胞の基本的活動を受けもつ細胞内部構造(細胞小器官、タンパク質複合体など)が存在する。細胞小器官は時々刻々細胞内部を動いているため、その時間、空間に関する情報を得ることは、細胞および細胞内部構造の機能を理解するうえで重要である。遺伝子の情報を管理している核や、エネルギーを生み出すミトコンドリアなどが細胞小器官の例である。細胞小器官は1個の細胞の中に1個から数百個程度存在し、同一の細胞小器官であっても、細胞内の位置により異なる役割を果たしている。生きた細胞内における特定の細胞小器官を空間選択的に、機能を阻害する、あるいは機能を活性化させる細胞内制御技術により細胞内構造の時空間的な動態や機能に関する情報を得ることができよう。細胞内部の細胞小器官やタンパク質に、レーザー光を集光すると、非接触で、その細胞小器官やタンパク質を移動させたり動きを止めたり、また、メスやはさみのように一部を取り除いたり、切断したりすることが可能である¹⁻⁶⁾。本稿では、近赤外領域の超短光パルスを用いて、細胞やその中

の細胞小器官やタンパク質を生かした状態のまま手術する細胞内手術(サージェリー)技術を紹介する。

2. 細胞内手術とは

細胞内手術とは、細胞が生きたまま、細胞内部の特定の構造の切開、破壊、機能阻害を行うことである。分子生物学的、生化学的手法では、特定の細胞小器官やタンパク質を阻害する試薬を用いることにより、細胞内の特定種すべての細胞小器官やタンパク質の機能阻害は可能であるが、特定の細胞小器官を限定して機能制御することはできない。

光マイクロニードルや原子間力顕微鏡(Atomic force microscopy; AFM)チップを用いた、細胞内のナノサージェリーでは、マイクロニードルやチップを挿入するため、空間選択的に特定の部位を阻害、加工できるが、直接細胞に接触し、細胞膜に穴をあけるため侵襲的である⁷⁻⁹⁾。このような細胞膜の損傷は細胞活性を低下させる原因となり、解析したデータが本来の生命現象を反映していない危険がつきまとう。また、細胞内は様々な構造体が存在していることから、目的外の細胞内構造にダメージを与えることも考えられる。さらに、従来の侵襲的手法では3次元的に任意の位置の細胞内部構造を手術することが難しい。

3. 可視光・紫外光を用いたレーザーサージェリー

レーザー光をレンズにより細胞内部に集光すると、集光点でのみ細胞内構造を手術することができる (Fig. 1). 簡単のため、レーザー光をレンズにより媒質内部に集光することを考えよう. ここで、媒質は紫外領域に吸収があるとすると、紫外領域の光では、光の強さに比例した線形吸収が起きる. 光を照射した全ての部分において光強度に比例した吸収 (1光子吸収) が起きるため、Fig. 2(a)のように、集光点以外のレーザー光が通った部分でも吸収が起きる. 高強度のレーザー光を高い開口数の対物レンズで強く集光すると、集光点近傍で1光子吸収を元にプラズマが発生し、サブミクロンの空間分解能で細胞内構造のレーザーサージェリーを行うことができる. 紫外や可視領域の連続光やナノ秒レーザーパルス、ピコ秒レーザーパルス光を、植物や動物細胞の細胞小器官の破壊や切開がサブミクロンの空間分解能で実現されている¹⁰⁻¹⁸. 紫外光やパルス幅の長い光を用いると集光領域以外でも損傷が生じること、内在物質による吸収により細胞が生存できないこと、熱の影響によりタンパク質が変性する恐れがあることが指摘されている.

4. フェムト秒レーザーを用いた細胞内ナノサージェリー

4.1 原理

近赤外領域のフェムト秒レーザーパルスを媒質内部に集光すると、Fig. 2(b)のように集光点付近においてのみ多光子吸収が起こる. 2光子励起蛍光顕微鏡で2光子励起による可視化を行うよりも、より高強度のフェムト秒レーザーパルスにより、細胞内部の特定部分を手術することができる. フェムト秒レーザーパルスを高い開口数の対物レンズで、細胞内に集光すると、集光点付近においてのみ、イオン化が生じ、プラズマが発生する. このプラズマ発生により、サブミクロンから数ミクロンの空間分解能で細胞内の構造に損傷を引き起こすことができる. 細胞内部の集光点でアブレーションが起こると考えてもよい. 近赤外領域の光を用いるため、集光領域以外の吸収がない、また、パルス幅が短いため熱や衝撃波の周りへの影響が少ない、といった特長があげられる. また、近赤外領域の光は細胞内の吸収が少ないことから、焦点

Fig. 1 Schematic diagram showing the procedure of femtosecond laser nanosurgery: femtosecond laser pulses are irradiated and the target organelle is selectively disrupted or dissected.

Fig. 2 Schematic diagrams showing (a) one-photon absorption by focusing laser beam in ultraviolet or visible region and (b) multi-photon absorption by femtosecond laser pulses.

領域外の光損傷は抑えられる. Königらは1999年にフェムト秒レーザーパルスを用い、生きた細胞内で染色体の切断¹⁹、DNAのトランスフェクション²⁰を実現している. 切断領域が100ナノメートル程度であるため、ナノサージェリーと呼ばれるようになった. 生細胞の細胞小器官のディスラプション、アクチンファイバーの切断、核のアブレーションと微小管の切断、神経軸索の切断と再生、固定細胞の染色体の切断、遺伝子導入、ショウジョウバエの胚内部のアブレーション、酵母菌の微小管の切断が報告されている²¹⁻³¹).

4.2 光源

フェムト秒レーザーサージェリーの光源は、(1)低い繰り返し周波数 (1~250 kHz) の再生増幅器を用いる方法と、(2)高繰り返し周波数 (~80 MHz) のフェムト秒レーザー発振器を用いる方法の2種類に大別される. (1)の再生増幅器を用いた場合、数nJ~数十nJのパルスエネルギーで、フェムト秒レーザーサージェリーが行われている. 再生増幅器を用いたフェムト秒レーザーシステムは繰り返し周波数が低いため、パルス間の熱の蓄積の影響は少ない. 一方、(2)のフェムト秒レーザー発振器を用いると、再生増幅器に比べてサブnJ領域の低いピークパルスで細胞内のレーザーサージェリーを行うことが可能である. フェムト秒レーザーサージェリーのメカニズムは十分に解明されていないが、増幅器では、熱の蓄積効果は無視でき、主に過渡的バブルによる熱弾性効果であると考えられ、気泡発生のしきい値より少し、高いエネルギーが必要である. 発振器では、弱いエネルギーで多くのパルス数を照射し、低密度プラズマによる蓄積的化学効果、自由電子生成による結合の切断 (化学的分解) が要因であると考えられている³²).

4.3 褪色とサージェリーの違い

細胞小器官のサージェリーを行う場合、多くの場合細胞小器官を蛍光タンパク質により可視化する. レーザー光を集光した場合、集光領域において、蛍光タンパク質の褪色後、回復する現象がある. これは、褪色させていないエリアの蛍光プローブや蛍光タンパクが移動し、褪色させた特定エリアに入り込んでくる現象である. 褪色の場合は、細胞小器官は変化を受けていないが、蛍光タ

ンパク質が褪色しているのみである。

はじめに、褪色とサージェリーの違いについて示そう²⁶⁾。チタンサファイアフェムト秒レーザー発振器からのレーザーパルスを、開口数が1.4の油浸対物レンズを用いて、細胞内に集光する。試料として、ヒト子宮頸部がん細胞由来である生きたHeLa細胞を用い、核をEGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) で標識している。核内の $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$ の領域内にフェムト秒レーザーパルス(中心波長925 nm, パルス幅約150 fs)のエネルギーを変化させて(0.26, 0.39 nJ/pulse, 照射時間1.1 秒), 同じ核内にそれぞれ照射し、蛍光回復を観察する。フェムト秒レーザーパルス集光照射前の1光子蛍光共焦点像と照射後の経時観察像を比較する。フェムト秒レーザーパルスの照射エネルギーが0.39 nJ/pulseのとき(Fig. 3 (a)), 集光領域の蛍光は消失する。この場合、蛍光回復は観察されない。一方、照射エネルギーが0.26 nJ/pulse (Fig. 3 (b))のとき、蛍光は消失するが、時間が経過するにつれて蛍光が回復の様子が観察される。また、フェムト秒レーザーパルス照射後の細胞を用いて、Hoechst 33342による核の再染色を試みたところ、フェムト秒レーザーパルス照射領域の蛍光が褪色した場合(0.26 nJ/pulse), EGFPおよびHoechst 33342からの蛍光はそれぞれ観察される。一方、照射領域の蛍光回復が見られなかった場合は、フェムト秒レーザーパルス照射45分後もEGFP, Hoechst 33342共に蛍光が観察されない。

以上のことから、蛍光回復および再染色法は、生細胞内の細胞小器官が阻害されたか否かを判別する指標になる。また、褪色とサージェリーとの違いを透過電子顕微鏡により判別する手法も提案されている²⁸⁾。フェムト秒レーザー発振器を用いた場合、エネルギーが低い場合は、蛍光標識した細胞内部構造から2光子蛍光が生じ2光子励起蛍光像を得ることができる。強度を上げると蛍光褪色が起こり、さらに強度を上げると、サージェリーを

Fig. 3 FRAP analysis of the enhanced green fluorescent protein (EGFP) labeled nucleus in HeLa cells at different energies. (a) 0.39 nJ/pulse and (b) 0.26 nJ/pulse. An EGFP labeled nuclear region of $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$ (square region) in a living HeLa cell was irradiated by femtosecond laser pulses at a wavelength of 925 nm.

行うことができる。

4.4 細胞小器官のサージェリー

フェムト秒レーザー発振器を用いたHeLa細胞内のミトコンドリアのサージェリー例について示す。光源としては、フェムト秒レーザー発振器(中心波長800 nm, 繰り返し周波数76 MHz, 集光点のパルス幅145 fs)を用いている。開口数が1.4の油浸対物レンズを用いて、レーザーパルスを細胞内に集光する。ミトコンドリアターゲット配列と融合させたEYFP(Enhanced Yellow Fluorescent Protein)を用いてHeLa細胞のミトコンドリアを可視化している。Fig. 4 (a)と(b)はフェムト秒レーザーパルス入射前後の蛍光像である。Fig. 4 (a)の矢印で示したミトコンドリアにエネルギーが0.39 nJ/pulseのフェムト秒レーザーパルス(照射時間32 ms, パルス数 2.4×10^6)を集光照射している。Fig. 4 (b)からレーザーパルス照射後、標的のミトコンドリアから蛍光が消失し、ミトコンドリアが破壊された様子が示される。また、標的のミトコンドリアから数 μm 離れたミトコンドリアには影響がないことがわかる。レーザーパルスを照射した領域のミトコンドリアからは蛍光回復が見られず、再染色されないことから、蛍光の消失は、褪色ではなく、ミトコンドリアが破壊されたということである。

さらに、微小領域の細胞小器官の手術をすることができても、細胞が死んでしまったり、細胞が正常な振る舞いをしなくなれば意味がない。すなわち、生きた細胞内の細胞小器官のナノサージェリーでは、レーザーフェムト秒レーザーパルスを照射した後、細胞の機能が損なわれないことが必要とされる。Fig. 4で示した、一つのミトコンドリアの手術後、12時間後、細胞分裂が完了した様子をFig. 5に示す²⁶⁾。さらに照射12時間後から16.5時間後にかけて、娘細胞の細胞移動現象が観察されている。レーザー照射した細胞は長時間観察により、細胞分裂が正常に進行し、さらに、分裂後、細胞移動も見られ、細胞の働きや細胞分裂に影響がないことが示された。また、原形質流動も観測されている。これは、レーザーパルス照射により $1 \mu\text{m}^3$ 程度の体積空間をサージェリーした後も、細胞の機能や活性が損なわれていないことを示している²⁶⁾。細胞の分裂活性を損なうことなく、生きた細胞内部の単一の細胞小器官を手術できるフェムト秒レー

Fig. 4 Surgery of a mitochondrion in a living HeLa cell. Stacked three-dimensional confocal images (a) before and (b) after femtosecond laser irradiation with 0.39 nJ/pulse (exposure time: 32 ms). A target mitochondrion is indicated by an arrow.

Fig. 5 Cell division after femtosecond laser surgery of a mitochondrion labeled with EYFP.

レーザーサージェリーは有用な手法であるといえる。

4.5 ミトコンドリアの断片化

サージェリーよりも高いエネルギーのフェムト秒レーザーパルスをもとにミトコンドリアに集光すると、集光点領域外のミトコンドリアに形状変化が見られる。照射エネルギー0.53 nJ/pulse(照射時間32 ms)でフェムト秒レーザーパルスをもとにミトコンドリアに集光照射すると、集光点領域外にある管状のミトコンドリアが断片化し(フラグメンテーション)、球状に変化する²⁶⁾。この形状変化は細胞全体に及ぶこともある。レーザー光照射により、細胞内のCa²⁺濃度が上昇し、ミトコンドリアの形状が変化するものと考えられている³³⁾。

4.6 タンパク質の局所的機能阻害・不活性化

ポストゲノム時代を迎え、RNAiなどのタンパク質機能阻害法により、様々なタンパク質の機能解析が進められている。また、レーザーを用いてタンパク質を加工、不活性化させるレーザー分子不活性化法(Chromophore-assisted laser inactivation: CALI)が提案されている。CALI法は、色素あるは金属ナノ粒子を化学標識した抗体やリガンドと目的タンパク質が特異的に結合した状態でレーザー光を照射することにより色素の発色団から活性酸素種(フリーラジカル)が生じ、そのラジカルが目的タンパク質の構造変化を誘起し、標的タンパクの機能を不活性化するというものである。しかし通常のCALIでは紫外光を用いた1光子励起に基づいているため、不活性化をおこさせる効率が悪く、空間選択性がない。

2005年高松らは、フェムト秒レーザーパルスの焦点近傍の標的タンパク質のみの不活性を可能にする多光子励起CALIの報告している^{34,35)}。ギャップ結合を持たないHeLa細胞にコネキシン(ギャップ結合タンパク質)とEGFPの融合タンパク質を強制発現させる。その結果、細胞間にコネキシン-EGFPから構成されるギャップ結合が構築される。このEGFPの蛍光部位にフェムト秒レーザーパルスを照射したところ、EGFPの褪色とともにギャップ結合の消失が観察されている。これは標的タンパク質分子の周辺にある構造を破壊することなく、標的タンパク質のみを不活性化させたことを示している。今後、生きた細胞内におけるタンパク質の機能解析において、特定のタンパク質が機能発現する空間の解析が重要であり、多光子励起CALIは空間選択的タンパク質機能阻害技術となりうるだろう。

5. おわりに

超短光パルスを用いて、細胞小器官やタンパク質の一部を阻害、活性化、不活性化するレーザーサージェリーについて述べた。ことにより、細胞全体の機能を損なうことなく、選択的に細胞内構造を手術できるレーザーサージェリーは、細胞内構造の機能や相互作用、細胞の複雑な振る舞いを解明できるだろう。また、光ピンセット技術とレーザーサージェリー技術を組み合わせることにより、細胞内構造の入れ替えも可能となり、品種改良、人工授精、遺伝子治療などへの応用が期待される。さらに、単一細胞小器官の可視化とレーザーサージェリーを組み合わせることにより、細胞小器官の細胞内機能分化を時空間的に解明が可能であり、細胞内の情報伝達メカニズムなどの解明に活用されることが期待される。

参考文献

- 1) 渡辺 歴, 松永 幸大: レーザ加工学会誌 **12** (2005) 44.
- 2) 佐藤 俊一: 杉岡 幸次, 矢部 明監修, レーザーマイクロ・ナノプロセッシング (シーエムシー出版, 2004) 4.2節.
- 3) 小原 實: 平尾 一之, 邸 建栄編, フェムト秒テクノロジー (化学同人, 2006) 第32章.
- 4) 増原 宏, 細川 陽一郎: レーザーが拓くナノバイオ (化学同人, 2005).
- 5) 藤田 克昌: 河田 聡監修, ナノオプティクス・ナノフォトニクスのすべて (フロンティア出版, 2006) p. 234.
- 6) Special Issue on Med. Laser Appl. **20**, No. 3 (2005).
- 7) M. Harsch, K. Bendrat, G. Hofmeier, D. Branscheid, and A. Niendorf: Am. J. Pathol. **158** (2001) 1985.
- 8) V. Pappas, P. G. Haydon, and E. Henderson: J. Cell Sci. **104** (1993) 427.
- 9) M. Firtel, G. Henderson, and I. Sokolov: Ultramicroscopy **101** (2004) 105.
- 10) R. L. Amy and R. Storb: Science **150** (1965) 756.
- 11) M. W. Berns, J. Aist, J. Edwards, K. Strahs, J. Girtan, P. McNeil, J. B. Rattner, M. Kitzes, M. Hammerwilson, L. H. Liaw, A. Siemens, M. Koonce, S. Peterson, S. Brenner, J. Burt, R. Walter, P. J. Bryant, D. Vandyk, J. Couclombe, T. Cahill, and G. S. Bern: Science **213** (1981) 505.
- 12) M. W. Berns, W. H. Write, and R. W. Steubing: Int. Rev. Cytol. **129** (1991) 1.
- 13) V. Venyopalan, A. Guerra III, K. Hahen, and A. Vogel: Phys. Rev. Lett. **88** (2002) 078103.
- 14) J. Colombelli, S. W. Grill, and E. H. K. Stelzer: Rev. Sci. Instrum. **75** (2004) 472.
- 15) A. Khodjakov, R. W. Cole, and C. L. Rieder: Cell. Motil. Cytoskeleton **38** (1997) 311.
- 16) A. Khodjakov, R. W. Cole, B. R. Oakley, and C. L. Rieder: Curr. Biol. **10** (2000) 59.
- 17) A. Khodjakov, S. La Terra, and F. Chang: Curr. Biol. **14** (2004)

- 1330.
- 18) E. L. Botvinick, V. Venugopalan, J. V. Shah, L. H. Liaw, and M. W. Berns: *Biophys. J.* **87** (2004) 4203.
 - 19) K. König, W. Riemann, and W. Fritzsche: *Opt. Lett.* **26** (2001) 819.
 - 20) U. K. Tirlapur and K. König: *The Plant J.* **31** (2002) 365.
 - 21) K. König: *Histochem. Cell Biol.* **4** (2000) 79.
 - 22) K. König: *J. Microsc.* **200** (2000) 83.
 - 23) U. K. Tirlapur and K. König: *Nature* **418** (2002) 290.
 - 24) W. Watanabe, N. Arakawa, S. Matsunaga, T. Higashi, K. Fukui, K. Isobe, and K. Itoh: *Opt. Express* **12** (2004) 4203.
 - 25) W. Watanabe, S. Matsunaga, T. Shimada, T. Higashi, K. Fukui, and K. Itoh: *Med. Laser Appl.* **20** (2005) 185.
 - 26) T. Shimada, W. Watanabe, S. Matsunaga, T. Higashi, H. Ishii, K. Fukui, K. Isobe, and K. Itoh: *Opt. Express* **13** (2005) 9869.
 - 27) N. Shen, D. Datta, C. B. Schaffer, P. LeDuc, D. E. Ingber, and E. Mazur: *Mech. Chem. Biosyst.* **2** (2005) 17.
 - 28) A. Heisterkamp, I. Z. Maxwell, E. Mazur, J. M. Underwood, J. A. Nickerson, S. Kumar, and D. E. Ingber: *Opt. Express* **13** (2005) 3690.
 - 29) M. F. Yanik, H. Cinar, H. N. Cinar, A. D. Chisholm, Y. Jin, and A. Ben-Yakar: *Nature* **432** (2004) 822.
 - 30) W. Supatto, D. Débarre, B. Moulia, E. Brouzés, J. -L. Martin, E. Farge, and E. Beaurepaire: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102** (2005) 1047.
 - 31) L. Sacconi, I. M. Tolić-Nørrelykke, R. Antolini, and F. S. Pavone: *J. Biomed. Opt.* **10** (2005) 014002.
 - 32) A. Vogel, J. Noack, G. Hüttman, and G. Paltauf: *Appl. Phys. B* **81** (2005) 1015.
 - 33) N. L. Smith, K. Fujita, T. Kaneko, K. Katoh, O. Nakamura, S. Kawata, and T. Takamatsu: *Appl. Phys. Lett.* **79** (2001) 1208.
 - 34) T. Tanabe, M. Oyamada, K. Fujita, P. Dai, H. Tanaka, and T. Takamatsu: *Nature Methods* **2** (2005) 503.
 - 35) 小山田 正人, 高松 哲郎: *レーザー研究* **34** (2006) 807.