超高速レーザが実現する新たな生物学の可能性

リチャード・ゴーハン

フェムト秒レーザの相互作用の性質を利用して、生体物質と直接作用する新手法が可能となり、細胞ごとに機能を調節できるようになる。

超高速レーザは1ps以下のパルスを発生させ、電子が周囲と相互作用する前に電子にエネルギーを伝達する。例えば、高強度では、電子は2つの光子からエネルギーを受け取り、そのエネルギーは分子振動や他の電子との相互作用で失うことはない[1]。このユニークな相互作用により、マイクロ加工や、生きた細胞の直接操作という独自の性質を実現できる。

フェムト秒レーザは熱伝達を最小限に抑え、材料が融解したり再凝固したりする前に材料をアブレーションできるため、非常に精巧なマイクロ加工が可能である。さらに、ビームを数ミクロンのスポットに集光すると、低エネルギーの光子2つを励起できる。このとき、2倍のエネルギーを持つ光子1つは励起しない。これは高強度の場合のみ起こることであり、ターゲット材料との相互作用は集光領域に限られる。

最初にフェムト秒レーザが開発されたのは1970年代だったが、生物学に関連した進歩は続いている。最近の代表的な開発例は2つある。マイクロ加工と、生きた細胞の直接刺激である。

トラップを設置する

フォトポリマーに特定の波長の光を照射すると、モノマーが結合してポリマーになる。重合波長の2倍のフェムト秒レーザパルスを材料に照射すると2光子重合（TPP）が生じる。これは照射付近でのみ起きるため、TPPは非常に精巧な形状を作製できる。

中国の東北大（Northeastern University）のハーイボー・ユー教授（Haibo Yu）とリャンチン・リウ教授（Lianqing Liu）らは、TPPを用いて、個々の細胞を機械的に捕捉する自己組織化構造を作製した[2]。200kHzで動作する1030nmレーザによる240fsパルスをフォトポリマーの1点に照射することで「マイクロピラー」を作製した。レーザ出力を変えたり焦点を動かしたりすることで、直径2～7μm、高さ5～40μmのマイクロピラーを作製した。また、5μmと10μmからなる二等辺三角形や、10～20μm間隔で4つのマイクロピラーを配置した「バタフライ」パターンなども作製した（**図1**）。光を照射後、未重合のフォトレジストを現像液で洗い流して乾燥させる。現像液が蒸発したら、毛細管現象によってマイクロピラーの先端が引き寄せられ、3次元（3D）ケージができあがる。

目的は、人が介入せずに、常に個々の細胞を保持する構造を作ることである。光学トラップは個々の細胞を保持できるが、複数の細胞を保持したり長時間保持したりする方法は簡単ではない。いくつかの原理証明実験を経て、ユー教授とリウ教授は光学トラップを

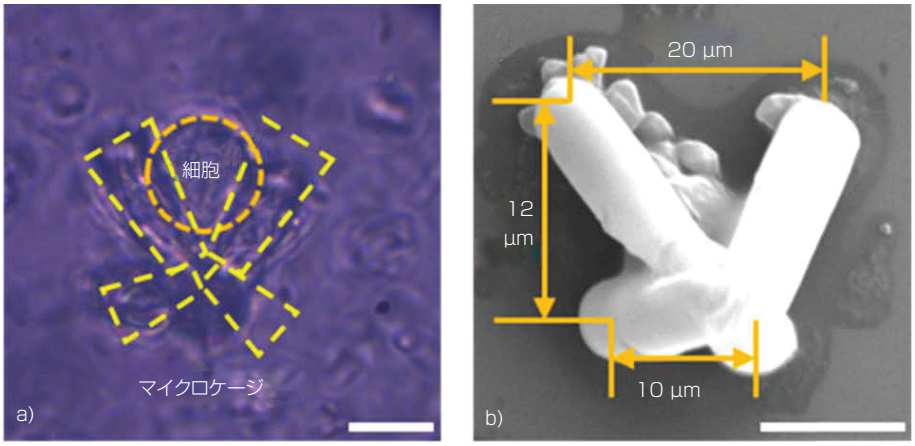

図1　フェムト秒レーザによって、フォトレジストの精巧な構造を作製できる。例えば、バタフライトラップに自己組織化する、このようなマイクロピラーがある。光学ツイーザーによって単一細胞をトラップに移動させる。顕微鏡写真（a）と電子顕微鏡写真（b）から、細胞が保持されていることがわかる。

用いて、個々のマウス線維芽細胞を3Dバタフライケージ内に移した。バタフライケージは、栄養剤添加や培地交換時に生じるような液体の流れがあっても、あるいは連続的な外力がなくても、細胞を保持できた。この新しい機能により、現在では個々の細胞の横断的な研究が可能となっている。

このように、超高速レーザによるマイクロマシン構造は生物学の研究に有用なだけでなく、生きた細胞の挙動を直接制御できる。

フレッシュな状態で細胞コントロール

超高速レーザはTPPと同様に、多光子顕微鏡に必要なピーク強度をもたらす。ここでは、フェムト秒レーザを用いて、公称吸収波長の2倍で蛍光ラベルを励起する。以前から、多光子顕微鏡がしばしば一時的にCa^{2+}シグナルを刺激することが研究者の間で知られていた[3]。中国の上海交通大（Shanghai Jiao Tong University）のハオ・ハー教授（Hao He）をはじめとする複数の国際機関の研究者は、これらの研究を続け、さまざまな種類の細胞でCa^{2+}の流入を特異的かつ決定的に促す超高速レーザ手法を発見した[4]。

カルシウムは、すべての真核生物において多くの細胞プロセスを制御する。細胞膜を介したCa^{2+}の制御や機能に関するメカニズムが多くある。メカニズムの1つにストア作動性カルシウム（SOC）流入がある。小胞体内でCa^{2+}濃度に対してSTIMI1タンパク質が反応し、Orai1という別のタンパク質が結合することで、細胞内にカルシウムを流入できるチャネルを形成する。Orai1チャネル形成の詳細はまだよくわかっていないが、Orai1が緊密な6量体を構成するとカルシウムチャネルが開くというのが一般的な見解である。

カルシウムシグナルは多くの生物プロセスに必要不可欠であるため、研究者はカルシウム流入を光学的に制御できる遺伝子改変を開発してきた。光制御は、特定の細胞を活性化するための最も侵襲性の低い方法だが、遺伝子改変は侵襲性が高い。ハー教授のチームは、2mWのフェムト秒レーザによる100fsパルスで照射した700nm光を細胞膜に当てることで、野生型細胞のCa^{2+}チャネルを活性化できることを発見した。

メカニズムを解明する

この効果を調べるため、ハー教授のチームはまず、蛍光カルシウムマーカーとともに細胞を培養し、488nmレーザ光源を用いた共焦点顕微鏡で培地をイメージングした。ターゲット細胞を同定してから、フェムト秒レーザを細胞膜の小さな領域（通常は2×2μm）に照射した。共焦点顕微鏡の画像により、細胞内のカルシウム濃度を定量化した。露光部においてカルシウム流入が発生し、細胞全体に広がることが観察された。これは**図2**に示すように、さまざまな種類の細胞で見られた。

このメカニズムは、一連の包括的な実験によって解明された。外部にCa^{2+}がある環境とない環境で実験を行い、カルシウム拡散が細胞内のCa貯蔵ではなく外部の環境によるものであることを証明した。Orai1とSTIM1タンパク質の機能を阻害するさまざまな方法を用いて、カルシウム流入においてSTIM1タンパク質は関与せず、Orai1チャネルを介して生じることがわかった。FRETラベリングにより、フェムト秒レーザを照射するとOrai1の緊密なヘキサマー形成が促進されることを確認した。

次に、フェムト秒レーザの波長を

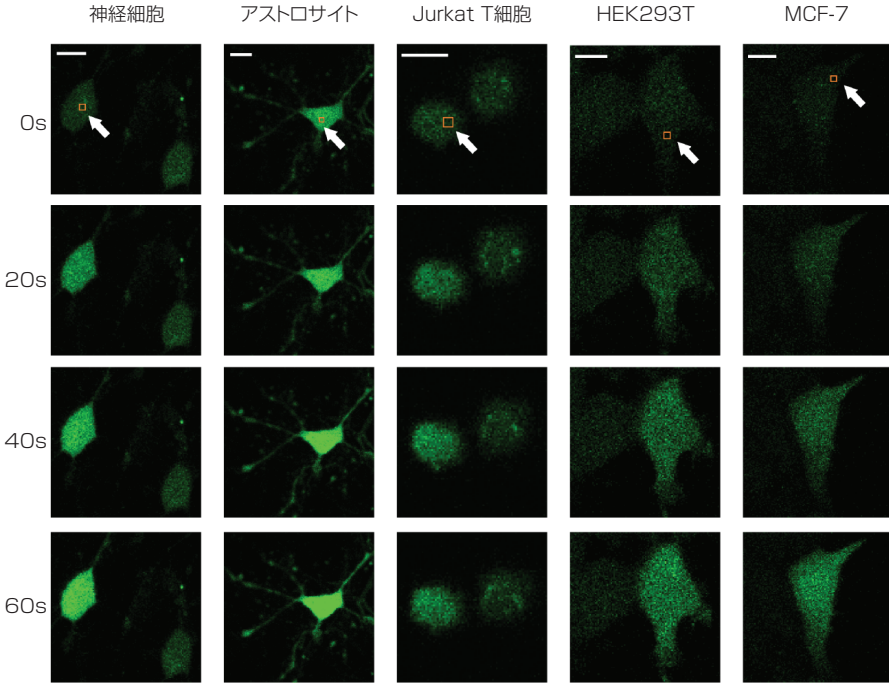

図2　画像内の赤い正方形は、フェムト秒レーザが照射された領域を、緑の蛍光はカルシウム流入を示す。

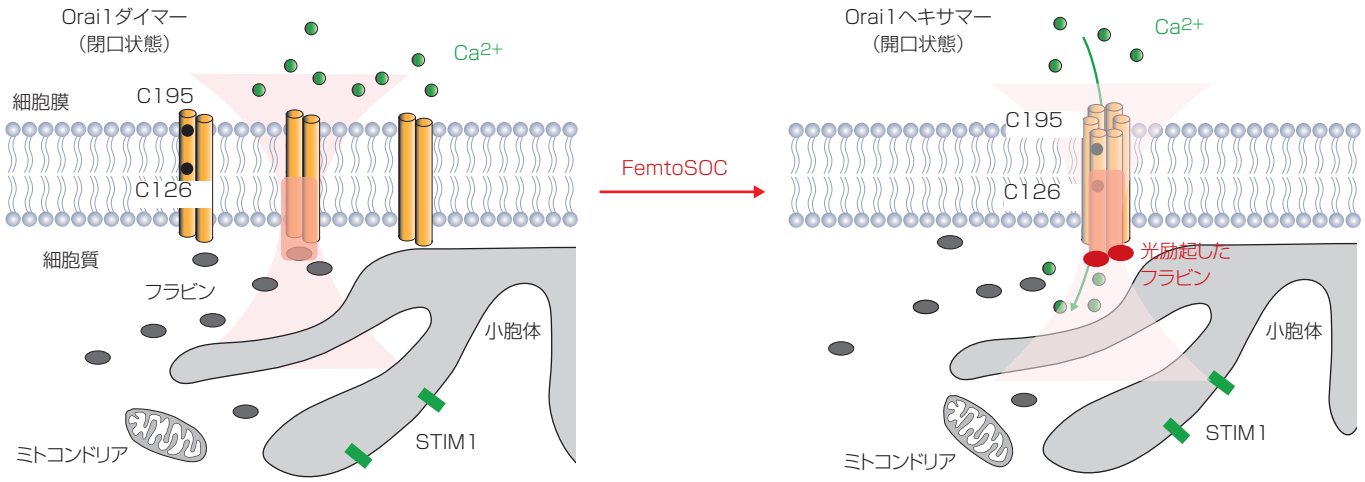

図3　ストア作動性のOrai1は通常、細胞内のカルシウム貯蓄量が少ないときに開口する。しかし、フェムト秒パルスによってフラビンが励起し、Orai1と結合してチャネル開口を促す。

700～960nmの範囲で照射したところ、最も短い波長でCa^{2+}流入が最大化することがわかった。水の吸収ピークから離れていることから、光熱効果が原因でないと考えられた。2光子吸収スペクトルがフラビンと一致したため、フラビンの励起がCaチャネル形成に関与している可能性が示唆された。励起阻害剤を用いて、**図3**に示すように、光励起されたフラビンがOrai1チャネルの開口を引き起こすことが確認された。

他の実験と合わせて、適切なフェムト秒レーザパルスを照射すると、SOCチャネルを介してカルシウム流入が引き起こされることがわかった。この方法はfemtoSOCと略されている。femtoSOCの有用性を実証するため、ハー教授のチームは、神経細胞、アストロサイト、MCF-7乳がん細胞など、さまざまな培養細胞においてSOCによってカルシウム流入を特異的に発生させた。また、生きているマウスの単一の神経細胞においてカルシウム流入を誘導できることを証明し、神経細胞の相互作用を調べる新たな道を開いた。

デンマークのコペンハーゲン大（University of Copenhagen）トランスレーショナル神経医学センターの平瀬肇（Hajime Hirase）教授は、アストロサイトを刺激してCa^{2+}レベルを増強するための光遺伝学的リソースを開発している。平瀬教授は最近、マウスにおいてアストロサイトのCa^{2+}上昇は記憶パフォーマンスを増強するすることを発見した[5]。平瀬教授はfemtoSOCの開発に関わっていないが、femtoSOCが「アストロサイトのカルシウムを操作するのに遺伝子改変マウスやアデノ随伴ウイルス（AAV）感染を必要としない」という点においては、認知プロセスを非侵襲的に研究できる可能性を評価している。神経細胞活性の活性化・不活性化をより正確に操作できるようになれば、この刺激法の価値はより高まると、平瀬教授は考えている。「脳の機能は、神経細胞の活動電位のタイミングと比率に依存するためである」。

平瀬教授のチームは、光遺伝学を使わずに、SOCチャネルを直接制御できることに満足している。

「これは光遺伝学を使わずに、光でイオンチャネルを高い特異性で制御する唯一の技術だ。メカニズムを解明することは非常に困難であるが」と、同教授は述べる。しかし、可能性には期待している。「われわれは、アルツハイマー病の治療を含め、本研究の一連の応用に取り組んでいる」。

参考文献
(1) R. R. Gattas and E. Mazur, Nat. Photon.（Apr. 2008）; doi:10.1038/nphoton.2008.48.
(2) P. Li et al., Opt. Express, 29, 7（Mar. 2021）; doi:10.1364/oe.420033.
(3) O. Garaschuk et al., Nat. Protoc., 1, 1（2006）; doi:10.1038/nprot.2006.58.
(4) P. Cheng et al., Cell Res., 0, 1-15（2021）; doi:10.1038/s41422-020-00463-9.
(5) Y. Iwai et al., Front. Neural Circuits, 15（2021）; doi:10.3389/fncir.2021.658343.

著者紹介
リチャード・ゴーハンは、米マウンテンオプティカルシステムズ社（Mountain Optical Systems）のオーナー、BioOptics World誌の寄稿記者。

LFWJ