

平成30年6月12日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15103

研究課題名(和文) 生きた脂質微小ドメインを可視化する高速超解像顕微鏡法の開発

研究課題名(英文) High-speed super-resolution microscopy to visualize living lipid microdomain

研究代表者

大友 康平(Otomo, Kohei)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：40547204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は回折限界以下の空間分解能とミリ秒の時間分解能を併せ持つ二光子顕微鏡法を構築し、生体内脂質微小膜ドメイン等の標的をリアルタイム可視化することを目的とした。そのために申請者らがこれまでに技術開発を行ってきた二光子STED顕微鏡法、多点走査型二光子顕微鏡法の更なる機能向上を試みた。当初予定していた両技術を統合した顕微鏡方法論の開発には至らなかったものの、両方法論の更なる機能向上を達成した。特に後者の多点走査型二光子顕微鏡法は汎用性が高かったため、北海道大学ニコンイメージングセンターにおける共用機器としての運用を開始した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at developing novel two-photon excitation microscopy which possesses the spatial resolution overcoming diffraction limits and millisecond temporal resolution to visualize living lipid microdomain in real time. To accomplish the purpose, we further improved both two-photon excitation stimulated emission depletion (STED) microscopy and multi-point scanning two-photon excitation microscopy, which we had developed so far. Although we have not developed the initially planned microscopy system which combined both technologies, resolutions and utilities of respective microscopy systems were successfully improved. Especially, the latter multi-point scanning system could be utilized for general purposes, thus we started to open this system as the equipment of Nikon imaging center at Hokkaido University.

研究分野：生物物理学

キーワード：二光子顕微鏡 超解像顕微鏡 STED顕微鏡 スピニングディスク顕微鏡 in vivoイメージング

1. 研究開始当初の背景

1997年に Simons �らが提唱した脂質ラフトモデルは、細胞膜を海に例え、海上に浮遊するラフト(いかだ)のような微小ドメインが、細胞内外コミュニケーションのプラットフォームとしてはたらくというものであった。脂質ラフトは、スフィンゴ脂質とコレステロールに富む、密にパッキングされた機能性微小ドメインであり、構成分子に依存して多様な機能を呈する。脂質ラフトは数~200 nm 程度という微小構造であり、機能性ドメインとして働く際に会合、形成、解離をミリ秒~サブ秒オーダーの高速で行うとされていた。これらの情報は、生化学、分子生物学的手法に加え、電子顕微鏡法、単一分子追跡法、各種分光法、さらに近年では超解像顕微鏡法により明らかにされてきた。しかし、生きた生体において、その構造を直接可視化できた例は未だ報告がなく、提唱から20年弱が経過した今なお、モデルであり続けている。

2. 研究の目的

当該研究は、生体内、すなわち水、油の双方を含む時空間的に不均一な散乱体中における微小構造を高速で追跡できる新規蛍光顕微鏡を開発することを目指す。このために、申請者がこれまでに取り組んできた生体深部可視化手法である二光子顕微鏡法の機能向上に関する研究を更に発展させる。これにより、提唱より20年来、モデルであり続けている細胞膜微小ドメインをリアルタイムで直接可視化する方法論を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 多点走査型二光子顕微鏡の機能向上
- ・ネオジミウム (Nd) レーザーの導入: これまでに我々が研究開発を行ってきたスピニングディスクキャナを用いた多点走査型二光子顕微鏡システムの機能拡張を図り、緑色蛍光発色団を効率よく励起できる近赤外レーザー光源として Nd レーザー光源の導入を行った。本光源は、従来のモード同期チタン-サファイア (Ti-Sa) レーザー光源の同帯域と比べ、繰返し周波数が低い反面、ピークパワーが高い。導入により、緑色蛍光発色団の二光子蛍光イメージングにおいて、およそ30倍の蛍光輝度が得られることが見込まれていた。
 - ・偏光分解イメージング機構の導入: 多点走査型二光子顕微鏡の検知光学系に対して、偏光分解イメージング機構を導入した。これにより、動物個体や組織の二光子励起蛍光観察時に同時検知が可能なコラーゲン分子に由来する第二次高調波発生 (SHG) 信号の実時間偏光分解イメージングを実施した。
- (2) 二光子励起誘導放出制御 (STED) 顕微鏡の機能向上
- ・時間同期半導体レーザー光源の導入: 超解像顕微鏡法の一つである STED 顕微鏡法

の原理を適用した二光子顕微鏡について、更なる機能向上を試みた。具体的には、これまで用いてきた Ti-Sa レーザー二光子励起光源、連続波の STED 光源に代わり、数ピコ秒の近赤外光パルス、数ナノ秒の赤色光パルスを発振する半導体レーザー光源を新たに導入した。2種の光パルスの時間的同期を電氣的に制御することにより、超解像効果の向上を図った。

4. 研究成果

- (1) 多点走査型二光子顕微鏡システムの機能拡張を図り、緑色蛍光発色団を効率よく励起できる Nd レーザー光源の導入を行い、光学系を最適化した。導入の結果、当初の見積り通り、これまでに用いてきた Ti-Sa レーザー光源と比べ、およそ30倍の輝度での緑色蛍光発色団の画像取得が可能となった。より長波長の高ピークパワー光源であり、以前申請者の手で導入を行ったイットリビウムレーザー光源と併用することで、緑、黄、赤色の蛍光発色団について高速かつ高輝度の生体内イメージングが可能となった。実際に本顕微鏡システムにより、麻酔下マウスの皮膚血管中を高速移動する血球成分の1秒あたり108フレームの高速での可視化、膵臓外分泌腺房細胞における Ca^{2+} 波動を数十細胞同時に、三次元的かつサブ秒の時間分解能での可視化に成功した。また、本顕微鏡システムの検知光学系に対して、偏光分解イメージング機構を導入した。これにより、動物個体や組織の二光子励起蛍光観察時に同時検知が可能なコラーゲン分子に由来する第二次高調波発生 (SHG) 信号の実時間偏光分解イメージングが可能となった。構築した顕微鏡システムを麻酔下のマウスに適用することで、ビデオレートの高速度にて、皮膚や骨格筋におけるコラーゲン分子配向変化の三次元情報を抽出することに成功した。
- (2) STED 顕微鏡法の原理を適用した二光子顕微鏡について、更なる機能向上に成功した。具体的には、これまで連続波を用いてきた STED 光を数ナノ秒のパルス光とし、二光子励起に用いた数ピコ秒パルスとの10ピコ秒精度で時間同期させることにより、誘導放出効率を向上させた。微小ビーズの蛍光像より空間分解能評価を行ったところ、新たに構築した顕微鏡システムは、これまでに我々が構築してきた顕微鏡のおよそ1.5倍、従来の二光子顕微鏡のおよそ3倍の空間分解能を有することがわかった。
- 研究期間において、本研究が当初の目的としていた脂質膜微小ドメインの可視化は達成できなかったものの、複数の新規かつ実用的な蛍光顕微鏡法の確立に成功した。今後は、本研究課題にて構築した方法論の組み合わせ、更なる最適化を行うことで、生きた動物個体内で分子構造情報を理解できるバイオイメージング手法の構築を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1) Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Yi-Cheng Fang, Jui-Hung Hung, Motosuke Tsutsumi, Ryosuke Kawakami, Hiroyuki Yokoyama, Tomomi Nemoto, Advanced easySTED microscopy based on two-photon excitation by electrical modulations of light pulse wavefronts, Biomedical Optics Express, 査読有、9 巻 6 号、2018 年、2671-2680 DOI: 10.1364/BOE.9.002671

2) Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Yi-Cheng Fang, Jui-Hung Hung, Yuichi Kozawa, Kohei Otomo, Shunichi Sato, Hiroyuki Yokoyama, Tomomi Nemoto, Improvement of two-photon microscopic imaging in deep regions of living mouse brains by utilizing a light source based on an electrically controllable gain-switched laser diode, SPIE Proceedings, 査読有、10498 巻、2018 年、104982L DOI: 10.1117/12.2288664

3) Shota Hiruma, Tomoko Kamasaki, Kohei Otomo, Tomomi Nemoto, Ryota Uehara, Dynamics and function of ERM proteins during cytokinesis in human cells, FEBS Letters, 査読有、591 巻 20 号、2017 年、3296-3309 DOI: 10.1002/1873-3468.12844.

4) 川上良介, 大友康平, 根本知己, 新規レーザーによる生体イメージング、光アライアンス, 査読無、28 巻 12 号、2017 年、21-25 DOI: 無し

5) 堤元佐, 大友康平, 一本嶋佐理, 川上良介, 根本知己, 多光子顕微鏡技術の新展開、生体の科学、査読無、68 巻 5 号、2017 年、392-393 DOI: 10.11477/mf.2425200660

6) 大友康平, 渡邊裕貴, 山中祐実, 後藤亜衣, 日比輝正, 根本知己, 新規光技術を用いた多光子顕微鏡の空間分解能・時間分解能向上、顕微鏡, 査読有、52 巻 2 号、2017 年、67-71 DOI: 無し

7) 大友康平, 根本知己, In vivo ナノ構造の可視化のための二光子顕微鏡法の超解像化、レーザー研究、査読有、44 巻、2016 年、658-662 DOI: 無し

[学会発表](計 29 件)

1) Kohei Otomo, Ai Goto, Tomomi Nemoto,

Real time polarization resolved imaging for living mice tissues by two-photon excitation spinning disk microscopy, Focus on Microscopy 2018 (国際学会) 2018 年、Singapore EXPO (Singapore)

2) 中村咲耶, 日出間純, 大友康平, 根本知己, 石田宏幸, 泉正範, 紫外線障害時のオルガネラ除去を担うオートファジーの解析、第 59 回植物生理学会大会、2018 年、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

3) Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Yi-Cheng Fang, Jui-Hung Hung, Yuichi Kozawa, Kohei Otomo, Shunichi Sato, Hiroyuki Yokoyama, Tomomi Nemoto, Improvement of two-photon microscopic imaging in deep regions of living mouse brains by utilizing a light source based on an electrically controllable gain-switched laser diode, SPIE BIOS (国際学会) 2018 年、The Moscone Center (San Francisco・United States)

4) 大友康平, 根本知己, 二光子顕微鏡法の機能拡張による生体内微細構造の可視化、第 3 回 北大部局横断シンポジウム(招待講演)、2018 年、北海道大学(北海道・札幌市)

5) 村田隆, 大友康平, 根本知己, 長谷部光泰, 植物の紡錘体形成に關与するか? 生体運動合同班会議 2018、2018 年、法政大学(東京都・千代田区)

6) 後藤亜衣, 大友康平, 中山博, 堀喬, 根本知己, 多点走査型 2 光子顕微鏡による生体組織の高速 SHG イメージング、日本顕微鏡学会北海道支部会、2017 年、北海道大学(北海道・札幌市)

7) Kohei Otomo, Tomomi Nemoto, Multi-Point Scanning Two-Photon Microscopy by Utilizing Novel High-Peak-Power Lasers, Taiwan-Japan Joint Meeting on Bioimaging for Young Researchers, 2017 年、Academia Sinica (Taipei・Taiwan)

8) Ai Goto, Kohei Otomo, Tomomi Nemoto, High-speed polarization resolved imaging for living mice tissues by two-photon excitation multi-point scanning microscopy, 18th RIES-Hokudai International Symposium (国際学会) 2017 年、シャトレーガトーキングダム(北海道・札幌市)

9) 山中祐実, 大友康平, 根本知己, 新規多点走査型 2 光子顕微鏡を用いたマウス腓腸 ex vivo 及び in vivo Ca²⁺イメージング、生化学若手の会、2017 年度生命科学系学会合同年

次大会、2017 年、神戸ポータランド (兵庫県・神戸市)

10) Kohei Otomo、Improvements of two-photon excitation microscopy by utilizing novel optical technologies、第 55 回日本生物物理学会年会 (招待講演)、2017 年、熊本大学 (熊本県・熊本市)

11) 根本知己、川上良介、大友康平、一本嶋佐理、山中祐実、2 光子顕微鏡による非侵襲的な生体組織観察の高度化、第 26 回日本バイオイメージング学会学術集会 (招待講演)、2017 年、東京薬科大学 (東京都・八王子市)

12) 山中祐実、大友康平、根本知己、多点走査型 2 光子顕微鏡を用いたマウス膵臓における in vivo Ca^{2+} イメージング、第 26 回日本バイオイメージング学会学術集会、2017 年、東京薬科大学 (東京都・八王子市)

13) 大友康平、根本知己、低線返し周波数・高ピークパワーレーザー光源による高速二光子イメージング、第五回アライアンス若手研究交流会、2017 年、東京工業大学 (神奈川県・横浜市)

14) Tomomi Nemoto、Ryosuke Kawakami, Terumasa Hibi, Kohei Otomo, Sari Ipponjima, Kazuaki Sawada, Ayano Tanabe、Improvement of in vivo Two-Photon Microscopy by utilizing novel optical technologies、CLEO PR, OECC & PGC 2017(招待講演)、2017 年、Sands Expo and Convention Centre (Singapore)

15) Kohei Otomo、Tomomi Nemoto、Improving two-photon microscopy for clear visualization of subcellular structures、International Symposium on Imaging Frontier 2017(招待講演)(国際学会)、2017 年、東京理科大学 (東京都・葛飾区)

16) 村田隆、大友康平、日比輝正、中山博史、根本知己、長谷部光泰、核膜-染色体相互作用の植物紡錘体形成における役割、第 69 回日本細胞生物学会大会 (招待講演)、2017 年、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

17) Kohei Otomo、Ai Goto, Yumi Yamanaka, Hiroshi Nakayama, Takashi Hori, Tomomi Nemoto、High speed imaging for green fluorescent proteins by utilizing multi-point scanning two-photon microscopy、Focus on Microscopy 2017 (国際学会)、2017 年、Bordeaux Convention Center (France・Bordeaux)

18) Masanori Izumi, Kohei Otomo, Sakuya

Nakamura, Jun Hidema, Tomomi Nemoto, Hiroyuki Ishida、Live cell imaging analysis of piecemeal autophagy for chloroplast degradation in Arabidopsis leaves、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年、鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市)

19) 大友康平、山中祐実、後藤亜衣、渡辺裕貴、根本知己、多点走査型二光子顕微鏡の技術開発と生物学応用、第二回北海道大学部局横断シンポジウム、2017 年、北海道大学 (北海道・札幌市)

20) Takashi Murata, Kohei Otomo, Hiroshi Nakayama, Tomomi Nemoto, Mitsuyasu Hasebe、3-Dimensional analyses of microtubule organization in cortical arrays of plant cells、The 1st ABiS Symposium Towards the Future of Advanced Bioimaging for Life Sciences (国際学会)、2017 年、岡崎コンベンションセンター (愛知県・岡崎市)

21) Yumi Yamanaka, Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Ayano Tanabe, Takashi Hori, Hiroshi Nakayama, Nobuyuki Hashimoto, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto、Development of multi-point scanning two-photon microscopy and application for in vivo imaging of pancreas、The 1st ABiS Symposium Towards the Future of Advanced Bioimaging for Life Sciences (国際学会)、2017 年、岡崎コンベンションセンター (愛知県・岡崎市)

22) 大友康平、根本知己、二光子顕微鏡法の高解像化、高速化、第四回五研究所アライアンス若手研究交流会 (招待講演)、2016 年、北海道大学 (北海道・札幌市)

23) 村田隆、大友康平、日比輝正、中山博史、根本知己、長谷部光泰、紡錘体形成機構のマルチカラー 3D タイムラプス解析、日本植物学会第 80 回大会、2016 年、沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)

24) 大友康平、2 光子顕微鏡の機能向上による蛍光バイオイメージングの高度化、東北大学 学際フロンティア研究所 主催 第一回フロンティアバイオイメージング研究会 (招待講演)、2016 年、東北大学 (宮城県・仙台市)

25) 大友康平、新規光学技術によるレーザー走査型顕微鏡の高度化と生物学応用、生化学若手の会、生物物理若手の会 合同企画 蛍光イメージングセミナー (招待講演)、2016 年、北海道大学 (北海道・札幌市)

26) Kohei Otomo、Tomomi Nemoto、

Improving "in vivo" two-photon microscopy imaging in living mouse brain, Academia Sinica Imaging Workshop (招待講演)(国際学会)、2016年、Academia Sinica (Taiwan・Taipei)

27) Kohei Otomo, Tomomi Nemoto, Novel multiphoton microscopy by manipulating parameters of laser light, the 23rd Pacific Science Congress (招待講演)(国際学会)、2016年、Academia Sinica (Taiwan・Taipei)

28) 山中祐実, 日比輝正, 小澤祐市, 大友康平, 田辺綾乃, 橋本信幸, 根本知己, トップハット型レーザービームを用いた多点走査型2光子顕微鏡の開発、2016年、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

29) 大友康平, 川上良介, 根本知己, 新しい技術の導入による二光子励起蛍光顕微鏡の高度化、第五回 関西光科学研究所セミナー (招待講演) 2016年、関西光科学研究所 (京都府・木津川市)

〔図書〕(計2件)

1) 根本知己, 大友康平, 日比輝正, 一本嶋佐理, 羊土社, 実験医学別冊「超解像イメージングができる!」、2016年、pp. 235-241.

2) Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Ipponjima Sari, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto, Taylor & Francis Books, Inc., SUPER-RESOLUTION IMAGING IN MEDICINE AND BIOLOGY, 2016年、pp. 189-214

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大友 康平 (OTOMO, Kohei)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号: 40547204

(3) 連携研究者

根本 知己 (NEMOTO, Tomomi)

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号: 50291084