

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06591

研究課題名(和文) 生体内ナノ構造を長期間にわたり可視化追跡する超解像顕微鏡法の開発

研究課題名(英文) Super resolution microscopy for long term observation of intravital nano-structures

研究代表者

大友 康平 (Otomo, Kohei)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40547204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外域超短パルスレーザー光源を用いた二光子励起レーザー走査型顕微鏡(二光子顕微鏡)法は、励起の多色性と局所性、深部到達性、低侵襲性という特徴を持つ。このことから、生体内微小構造の可視化解析に汎用されている。本研究課題は、生体内微細構造の長期間に渡る可視化解析法の確立を目指し、研究代表者らがこれまで開発に取り組んできた超解像顕微鏡法および高速撮像技術を応用した二光子顕微鏡法技術を更に展開する技術開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光バイオイメージング法は、生命科学からのニーズに応える形で、日進月歩の技術革新を続けている。その一方で、時空間分解能などの極限的なイメージング指標に対する生体毒性のトレードオフがかねてから指摘されている。多くの観察結果に対する侵襲性の影響は無視されるか、その影響が危惧される実験結果は排除されることがほとんどである。そこで、本研究で実施したイメージング技術開発は、侵襲性の低さについても重きを置いた。その結果として提案した新規顕微鏡システムは、特に、投薬や治療の生体への効果の正しい評価が鍵となる医学・薬学研究におけるツールとしての実用化が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Two-photon excitation laser scanning microscopy (TPLSM) is widely used as a powerful method for the visualization of the dynamical molecular and cellular phenomena in living specimens. TPLSM is primarily used because of its superior penetration depth and less-invasiveness in specimens owing to its near-infrared excitation laser wavelength in comparison to the wavelength of single-photon excitation-based systems. In this research project, the principal researcher developed novel TPLSM methodologies based on the expertise about super-resolution microscopy and high-speed imaging for long-term visualizations of intravital nano/micro-structures.

研究分野：生物物理学

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

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

蛍光顕微鏡法は、生体分子を蛍光標識し、顕微可視化する解析手法であり、生物学、医学・薬学研究者の要求に応える形で、多様な技術発展を遂げてきた。中でも、蛍光顕微鏡の空間分解能の限界についての定説を打破した超解像顕微鏡法が 2014 年のノーベル賞の受賞対象となったことは記憶に新しく、研究開始当初、世界中の研究者が本法について更なる機能向上を試みていた。しかしながら、イメージングに求められるパラメータは空間分解能のみではない。時間分解能、深部到達性、視野の広さ、長期観察への適合性、生体への低侵襲性、簡便性等の重要なパラメータが多数存在し、これらは互いにトレードオフの関係にある。そのため、研究者は可視化対象・現象をよく精査した上で、多様化する蛍光顕微鏡法、他の可視化方法論の中から、使うべき方法を選定する必要があると、研究代表者は考えていた。

近赤外域超短パルスレーザー光源を用いた二光子励起レーザー走査型顕微鏡 (二光子顕微鏡) 法は、励起の多色性と局所性、深部到達性、低侵襲性という特徴を持つ。研究代表者が当時所属していた北海道大学 電子科学研究所 根本知己 教授が主導する研究グループは、発足当初より本手法の高度化を図る開発研究を行っており、その中で、生きたマウスの脳表層より 1.6 mm 深部における海馬領域について、単一細胞レベルで可視化することに世界で初めて実現した (Kawakami *et al.*, *Sci. Rep.* 2013; *Biomed. Opt. Express* 2015)。本例が象徴する通り、二光子顕微鏡法は、通常の光学顕微鏡法では観察が困難な生体試料内部の可視化解析法といえる。一方で、生体深部におけるサブ細胞レベルの構造、超解像顕微鏡法が対象とするようなナノ構造の *in vivo* 可視化追跡は、薬学を始めとする多くの生物学研究分野からの要求であり、実用性を含めた実現可能性は本研究課題の核心をなす学術的な「問い」であった。一般に、光学顕微鏡の空間分解能は光の回折により決定される集光スポットサイズに依存し、その限界は波長の半分程度である。これは二光子顕微鏡においても例外ではなく、近赤外光を励起に用いる原理上、一光子励起顕微鏡のそれに比べてやや劣る。本法に対し、超解像顕微鏡法の原理を併用した空間分解能向上研究も当時試みられてはいたものの、実用性に欠ける難点が指摘されていた。

2. 研究の目的

上記の背景を鑑み、研究代表者らがこれまで技術開発してきた誘導放出制御 (STED) 顕微鏡法を応用した二光子顕微鏡法 (Otomo *et al.*, *Opt. Express* 2014; *Biomed. Opt. Express* 2018) を更に発展させ、生体内ナノ構造を長期間に渡って可視化追跡できる新規方法論の確立を目的とした。また、研究代表者が並行して技術開発に取り組んできた多点走査型二光子顕微鏡法 (Otomo *et al.*, *Anal. Sci.* 2015) を基盤とし、高空間分解能を維持しつつも高速、多色、低侵襲性を両立する新しい蛍光バイオイメージング技術についても、開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 二光子 STED 顕微鏡法の高度化

透過型液晶デバイス・半導体レーザー光源を用いた顕微鏡システムの構築：長期的な観察を鑑み、研究代表者がこれまでに技術開発に取り組んできた透過型液晶デバイス (iLCD) 技術・半導体レーザー光源を基盤とした二光子 STED 顕微鏡について、機能向上を試みた。具体的には、新規ハイピークパワー STED 光パルス光学系を導入し、二光子励起光パルスとの時間遅延をピコ秒の精度にて、電氣的に制御できる仕様とした。

STED イメージングに適した蛍光発色団の選定：長期的な可視化追跡を実現するために、二光子励起効率が高く、光褪色に強い蛍光発色団についての選定を行った。構築システムの二光子励起波長 1064 nm、STED 波長 638、655 nm にて、様々な蛍光タンパク質、蛍光色素について、STED 効率、光褪色耐性等を網羅的に調査した。関連して、市販の蛍光発色団のみならず、共同研究者らにより新規開発された蛍光発色団についても二光子励起効率測定に供した。

(2) 多点走査型二光子顕微鏡法の技術展開

偏光分解検出による高速分子配向イメージング：従来の超解像顕微鏡法とは異なるアプローチにて、空間分解能を上回る形態情報を高速抽出する目的で、検出光学系に偏光分離光学系の導入を行なった。検出光学系に偏光ビームスプリッターを導入し、二光子蛍光および第二次高調波発生信号について、*s* 偏光成分と *p* 偏光成分を分離し、独立にカメラに結像できる仕様に変更した。構築したシステムを用い、マウス皮膚、筋繊維、形質膜を蛍光標識した膵臓外分泌腺房細胞の偏光分解イメージングを実施した。

新規 918 nm ハイピークパワーレーザー光源の導入：代表者らが構築してきた多点走査型 2 光子顕微鏡システムはスピニングディスク共焦点ユニットをベースとしており、数百点の焦点を並列走査することで、高時空間分解能イメージングを実現する。励起光を多点分割する原理上、高いピークパワーのレーザー光源が必要であったが、バイオイメージングにおいて最も汎用性が高い緑色蛍光発色団を励起できる 900-950 nm 帯域の超短パルス光源は市販されていなかった。このことから、918 nm 帯域において高いピークパワーを実現するネオジウムドープ

ファイバーレーザー光源を新規開発し、システムに導入して性能を精査した。

多チャンネル検出・線形アンミキシング法の適用による多色 3D タイムラプスイメージング：高速撮像による低毒性イメージング手法である多点走査型二光子励起顕微鏡法について、三色以上の多色イメージングが行える仕様とする改変を行った。具体的には、2 励起光パルス高速切換照射光学系の導入、線形スペクトル分離法による蛍光信号分離の実装を行った。これにより、哺乳類および植物培養細胞の有糸分裂時における複数細胞内小器官の三次元追跡を行い、侵襲性とともに性能の評価を行った。

4 . 研究成果

(1) 二光子 STED 顕微鏡法の高度化

iLCD 技術および半導体レーザー光源技術の併用により、二光子励起光、STED 光の両光パルスを時空間的に同期させることに成功した。連続発振レーザー光源と比べ、照射強度を 2 桁程度抑えることで、光褪色は有意に抑えられ、同一標本の複数光学断層について、100 nm を切る空間分解能を達成した。これらの成果について、原著論文を投稿し、受理された (Ishii *et al.*, *Biomed. Opt. Express* 2019)。関連して、本法に用いるレーザー光源の波長に適した蛍光発色団の選定を行い、高い二光子励起効率を有する新規蛍光発色団について、共同研究成果を発表した (Inoue *et al.*, *Cell* 2019; Avena *et al.*, *ACS Omega* 2020)。

(2) 多点走査型二光子顕微鏡法の技術展開

まず、偏光分離光学系の導入により、ビデオレートを上回る高速にて生体分子の配向を可視化できる顕微鏡システムの構築に成功した。本顕微鏡システムを用いることにより、色素標識対象分子の二光子励起蛍光のみならず、コラーゲン等の非標識生体分子の第二次高調波発生光についても実時間で偏光異方性を解析できることを立証した (Goto *et al.*, *Front. Phys.* 2019)。また、緑色蛍光タンパク質の二光子吸収断面積のピーク波長に対応する 918 nm にて発振するネオジミウムドープファイバーレーザー光源を導入して顕微鏡システムを最適化した。構築したシステムは、通常モード同期チタンサファイアレーザー光源と比べ 30 倍高輝度な緑色蛍光イメージングを達成した。本システムをマウス膵臓外分泌腺の *in vivo* イメージングに適用し、アゴニスト刺激への応答を観察した結果、6,000 万 μm^3 の三次元領域を 0.4 Hz の時間分解能で記録することに成功した (Otomo *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020)。さらに、多チャンネル検出・線形アンミキシング法の適用により、三色・四色の多重標識を施した培養細胞について、有糸分裂の過程の三次元タイムラプス追跡を行った。光毒性の評価のため、一光子励起ベースのシステムにて同様の測定を行った結果、一光子励起においては、細胞分裂の進行が有意に阻害されることがわかった (Kamada *et al.*, *Sci. Rep.* 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計25件（うち査読付論文 18件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 15件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 大友康平、山口和志、石井宏和、根本知己 | 4. 巻 62 |
| 2. 論文標題 二光子顕微鏡法の高解像化・高速化への展開 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 生物物理 | 6. 最初と最後の頁 131-133 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.62.131 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 根本知己、大友康平、山口和志、高橋泰伽 | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 新規的な技術を用いた二光子顕微鏡による生体イメージングの展開 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 レーザー研究 | 6. 最初と最後の頁 68-71 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Takafumi Kamada, Kohei Otomo, Takashi Murata, Kaito Nakata, Shota Hiruma, Ryota Uehara, Mitsuyasu Hasebe, Tomomi Nemoto | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Low-invasive 5D visualization of mitotic progression by two-photon excitation spinning-disk confocal microscopy | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 809 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-04543-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 大友康平、野中茂樹、亀井保博 | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 何が出来る？どこで使える？先端蛍光顕微鏡使い分けガイド | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 実験医学 | 6. 最初と最後の頁 67～72 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 大友康平、根本知己 | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 二光子顕微鏡法の技術展開と生体イメージング応用 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 OPTRONICS | 6. 最初と最後の頁 99 ~ 103 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 大友康平、根本知己 | 4. 巻 RTM-21 |
| 2. 論文標題 二光子顕微鏡法の機能向上と生理学応用 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 レーザー学会第557回研究報告 | 6. 最初と最後の頁 11 ~ 16 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 大友康平、高橋泰伽、山口和志、石井宏和、根本知己 | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 生命多光子顕微鏡による深部高解像・超解像イメージング | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 光学 | 6. 最初と最後の頁 141 ~ 146 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Taiga Takahashi, Hong Zhang, Kohei Otomo, Yosuke Okamura, Tomomi Nemoto | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Protocol for constructing an extensive cranial window utilizing a PEO-CYTOP nanosheet for in vivo wide-field imaging of the mouse brain. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 STAR Protocols | 6. 最初と最後の頁 100542 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100542 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Otomo Kohei, Goto Ai, Yamanaka Yumi, Hori Takashi, Nakayama Hiroshi, Nemoto Tomomi | 4. 巻 529 |
| 2. 論文標題 High-peak-power 918-nm laser light source based two-photon spinning-disk microscopy for green fluorophores | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 238 ~ 242 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.213 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamaguchi Kazushi, Kitamura Ryoji, Kawakami Ryosuke, Otomo Kohei, Nemoto Tomomi | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 In vivo two-photon microscopic observation and ablation in deeper brain regions realized by modifications of excitation beam diameter and immersion liquid | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE | 6. 最初と最後の頁 e02372300 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0237230 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Takahashi Taiga, Zhang Hong, Kawakami Ryosuke, Yarinome Kenji, Agetsuma Masakazu, Nabekura Junichi, Otomo Kohei, Okamura Yosuke, Nemoto Tomomi | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 PEO-CYTOP Fluoropolymer Nanosheets as a Novel Open-Skull Window for Imaging of the Living Mouse Brain | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 101579 ~ 101579 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101579 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Nakamura Sakuya, Hagihara Shinya, Otomo Kohei, Ishida Hiroyuki, Hidema Jun, Nemoto Tomomi, Izumi Masanori | 4. 巻 62 |
| 2. 論文標題 Autophagy Contributes to the Quality Control of Leaf Mitochondria | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology | 6. 最初と最後の頁 229 ~ 247 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa162 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamaguchi Kazushi, Otomo Kohei, Kozawa Yuichi, Tsutsumi Motosuke, Inose Tomoko, Hirai Kenji, Sato Shunichi, Nemoto Tomomi, Uji-i Hiroshi | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Adaptive Optical Two-Photon Microscopy for Surface-Profiled Living Biological Specimens | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 ACS Omega | 6. 最初と最後の頁 438 ~ 447 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.0c04888 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Wen Chentao, Miura Takuya, Voleti Venkatakaushik, Yamaguchi Kazushi, Tsutsumi Motosuke, Yamamoto Kei, Otomo Kohei, Fujie Yukako, Teramoto Takayuki, Ishihara Takeshi, Aoki Kazuhiro, Nemoto Tomomi, Hillman Elizabeth MC, Kimura Koutarou D | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 3DeeCellTracker, a deep learning-based pipeline for segmenting and tracking cells in 3D time lapse images | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 e59187 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.59187 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 石井宏和, 大友康平, Jui-Hung Hung, 堤元佐, 横山弘之, 根本知己 | 4. 巻 49 |
| 2. 論文標題 新規パルス光源系を用いた二光子STED顕微鏡の開発 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 光学 | 6. 最初と最後の頁 232 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 大友康平、石井宏和、根本知己 | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 二光子顕微鏡の技術開発と生物学応用 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 光アライアンス | 6. 最初と最後の頁 42 - 45 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------------------|
| 1. 著者名 Avena Ramon Francisco, Qiao Lin, Fujii Yuki, Otomo Kohei, Ishii Hirokazu, Suzuki Takeyuki, Tsujino Hirofumi, Uno Tadayuki, Tsutsumi Yasuo, Kawashima Yusuke, Takagi Tatsuya, Murai Kenichi, Nemoto Tomomi, Arisawa Mitsuhiro | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Absorption, Fluorescence, and Two-Photon Excitation Ability of 5-Phenylisolidolo[2,1-a]quinolines | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 ACS Omega | 6. 最初と最後の頁 2473 ~ 2479 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b04070 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Zhang Hong, Yarinome Kenji, Kawakami Ryosuke, Otomo Kohei, Nemoto Tomomi, Okamura Yosuke | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Nanosheet wrapping-assisted coverslip-free imaging for looking deeper into a tissue at high resolution | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE | 6. 最初と最後の頁 e0227650 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0227650 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sasaki Takema, Tsutsumi Motosuke, Otomo Kohei, Murata Takashi, Yagi Noriyoshi, Nakamura Masayoshi, Nemoto Tomomi, Hasebe Mitsuyasu, Oda Yoshihisa | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 A Novel Katanin-Tethering Machinery Accelerates Cytokinesis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Current Biology | 6. 最初と最後の頁 4060 ~ 4070.e3 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.09.049 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ishii Hirokazu, Otomo Kohei, Hung Jui-Hung, Tsutsumi Motosuke, Yokoyama Hiroyuki, Nemoto Tomomi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Two-photon STED nanoscopy realizing 100-nm spatial resolution utilizing high-peak-power sub-nanosecond 655-nm pulses | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biomedical Optics Express | 6. 最初と最後の頁 3104 ~ 3104 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.10.003104 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Inoue M, Takeuchi A, Manita S, Horigane S, Sakamoto M, Kawakami R, Yamaguchi K, Otomo K, Yokoyama, Kim R, Yokoyama T, Takemoto-Kimura S, Abe M, Okamura M, Kondo Y, Quirin S, Ramakrishnan C, Imamura T, Sakimura K, Nemoto T, Kano M, Fujii H, Deisseroth K, Kitamura K, Bito H | 4. 巻 177 |
| 2. 論文標題 Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cell | 6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1360.e24 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.04.007 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 石井宏和, 根本知己, 大友康平 | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 2光子励起顕微鏡法のナノイメージングへの展開 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 光アライアンス | 6. 最初と最後の頁 49-53 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 大友康平, 石井宏和, 根本知己 | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 透過型液晶素子を用いた二光子励起STED顕微鏡 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 フォトニクスニュース | 6. 最初と最後の頁 192-195 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Goto Ai, Otomo Kohei, Nemoto Tomomi | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Real-Time Polarization-Resolved Imaging of Living Tissues Based on Two-Photon Excitation Spinning-Disk Confocal Microscopy | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Physics | 6. 最初と最後の頁 Article56 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphy.2019.00056 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto Kei, Otomo Kohei, Nemoto Tomomi, Ishihara Seiichiro, Haga Hisashi, Nagasaki Akira, Murakami Yota, Takahashi Masayuki | 4. 巻 376 |
| 2. 論文標題 Differential contributions of nonmuscle myosin IIA and IIB to cytokinesis in human immortalized fibroblasts | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Cell Research | 6. 最初と最後の頁 67~76 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.01.020 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計38件 (うち招待講演 19件 / うち国際学会 14件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 大友康平, 石井宏和, 根本知己 |
| 2. 発表標題 二光子顕微鏡の高分解能化による生体内微細構造イメージング |
| 3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kohei OTOMO |
| 2. 発表標題 High-resolution intravital imaging based on novel two-photon microscopic technologies |
| 3. 学会等名 The 10th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kohei Otomo, Tomomi Nemot |
| 2. 発表標題 二光子顕微鏡法の高時空間分解能化と生体イメージング応用 |
| 3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第42回年次大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大友康平, 根本知己 |
| 2. 発表標題 二光子顕微鏡法の機能向上と生理学応用 |
| 3. 学会等名 レーザー学会第557回研究会「光・レーザーの医学・医療応用」 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 大友康平, 石井宏和, 根本知己 |
| 2. 発表標題 二光子励起顕微鏡法の時空間分解能向上 |
| 3. 学会等名 第11回 名古屋大学医・生理研合同シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大友康平, 根本知己 |
| 2. 発表標題 新規二光子顕微技術による低侵襲生体イメージング |
| 3. 学会等名 理学研究所研究会 「細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線」 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kohei Otomo |
| 2. 発表標題 Improving two-photon excitation microscopy for deeper, sharper and/or faster intravital imaging |
| 3. 学会等名 44th Meeting of Australian Society for Biophysics (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kohei Otomo, Takafumi Kamada, Ai Goto, Yumi Yamanaka, Tomomi Nemoto |
| 2. 発表標題 Two-Photon Excitation Spinning-Disk Confocal Microscopy and Its Biological Applications |
| 3. 学会等名 Focus On Microscopy 2020 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大友康平, 根本知己 |
| 2. 発表標題 二光子励起顕微鏡の機能向上による多次元生細胞イメージング |
| 3. 学会等名 生理学研究所研究会 「細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線」 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kohei Otomo |
| 2. 発表標題 Two-photon excitation confocal spinning-disk microscopy for real-time visualizations of biological phenomena |
| 3. 学会等名 A3 Foresight & 5 Star Alliance Joint Workshop on Organic/Inorganic Hybrid Nano Materials and Bio Imaging (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kohei Otomo |
| 2. 発表標題 Improving two-photon excitation microscopy for deeper, sharper and/or faster intravital imaging |
| 3. 学会等名 44th Meeting of Australian Society for Biophysics (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takashi MURATA, Kohei OTOMO, Tomomi NEMOTO, Mitsuyasu HASEBE |
| 2. 発表標題 Origin of mitotic spindle microtubules in plant cells |
| 3. 学会等名 第 58 回 日本生物物理学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Noritaka MOTOKI, Kohei OTOMO, Tomomi NEMOTO, Akatsuki KIMURA |
| 2. 発表標題 Measurement of physical properties underlying the chromatin mobility in interphase nuclei |
| 3. 学会等名 第 58 回 日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡辺美咲, 村田隆, 堤元佐, 大友康平, 根本知己, 西山智明, 土金勇樹, 関本弘之 |
| 2. 発表標題 ヒメミカヅキモにおける蛍光標識CenH3タンパク質の発現による染色体可視化 |
| 3. 学会等名 日本藻類学会第45回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山口和志, 大友康平, 小澤祐市, 堤元佐, 猪瀬朋子, 平井健二, 佐藤俊一, 根本知己, 雲林院宏 |
| 2. 発表標題 空間光位相変調器を用いた収差補正による生体組織深部の微細構造の可視化 |
| 3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大友康平, 根本知己 |
| 2. 発表標題 Improvements of two-photon microscopy techniques for understanding intravital phenomena |
| 3. 学会等名 第8回 脳機能と脳型計算機に関するRIEC国際シンポジウム(招待講演)(国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大友康平 |
| 2. 発表標題 生命現象の可視化のための二光子顕微技術開発 |
| 3. 学会等名 日本分光学会 令和元年度 生細胞分光部会シンポジウム(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大友康平 |
| 2. 発表標題 レーザー走査型蛍光顕微鏡の基礎, 光技術応用による機能向上 |
| 3. 学会等名 定量生物学の会 北海道キャラバン(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大友康平、日比輝正、小澤祐市、横山弘之、佐藤俊一、根本知己 |
| 2. 発表標題 生物イメージングのための多光子顕微技術開発 |
| 3. 学会等名 第7回糸状菌分子生物学研究会若手の会(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kohei Otomo |
| 2. 発表標題 Improvements of two-photon excitation fluorescence microscopy for deeper, sharper and/or faster bio imaging |
| 3. 学会等名 JSPS Core-to Core Program A iC-Cubix3 Kick-off meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大友康平 |
| 2. 発表標題 二光子励起顕微鏡の機能向上と生体内部高精細イメージング |
| 3. 学会等名 第14回 日本分子イメージング学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kohei Otomo |
| 2. 発表標題 Improving two-photon microscopy for deeper, sharper and/or faster bioimaging |
| 3. 学会等名 NIG seminar, the 2050th Biological Symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鎌田恭史、大友康平、村田隆、比留間翔太、上原亮太、長谷部光泰、根本知己 |
| 2. 発表標題 2光子スピニングディスク顕微鏡による低侵襲4Dスペクトルイメージング |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazushi Yamaguchi, Kohei Otomo, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato and Tomomi Nemoto |
| 2. 発表標題 In vivo visualization of dendritic spines in deep regions of the mouse frontal cortex with two-photon excitation adaptive optical (AO) microscopy |
| 3. 学会等名 定量生物学の会 北海道キャラバン |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kohei Otomo, Takafumi Kamada, Takashi Murata, Mitsuyasu Hasebe, Tomomi Nemoto |
| 2. 発表標題 Four-color three-dimensional live cell imaging by two-photon excitation spinning disk confocal microscopy |
| 3. 学会等名 Focus On Microscopy 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hirokazu Ishii, Kohei Otomo, Jui-Hung Hung, Motosuke Tsutsumi, Hiroyuki Yokoyama, Tomomi Nemoto |
| 2. 発表標題 Compact two-photon excitation STED nanoscopy with high-peak-power sub-nanosecond 655-nm pulsed light source |
| 3. 学会等名 Focus On Microscopy 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 K. Otomo, T. Nemoto |
| 2. 発表標題 Improving two-photon microscopy for clear visualization of sub cellular structures |
| 3. 学会等名 Nikon Imaging Center Directors' meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 K. Otomo, T. Nemoto |
| 2. 発表標題 Improving two-photon microscopy for clear visualization of intravital structures |
| 3. 学会等名 The 1st international joint symposium of CEFMS-NTCU, RCAS-AS and 5-star Alliance (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鎌田恭史, 大友康平, 村田隆, 長谷部光泰, 根本知己 |
| 2. 発表標題 多点走査型二光子顕微鏡による四重標識生細胞の三次元経時観察 |
| 3. 学会等名 第27回 バイオイメージング学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 後藤亜衣, 大友康平, 根本知己 |
| 2. 発表標題 多点走査型二光子顕微鏡への偏光分離光学系の導入と生体イメージングへの応用 |
| 3. 学会等名 第27回 バイオイメージング学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 後藤亜衣, 大友康平, 根本知己 |
| 2. 発表標題 高速偏光分解イメージング法による生体組織の観察 |
| 3. 学会等名 第98回 日本生理学会 北海道地方会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 後藤亜衣, 大友康平, 根本知己 |
| 2. 発表標題 多点走査型二光子顕微鏡への偏光分離光学系の導入と生体組織の分子配光イメージング |
| 3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 安宅光倫, 鎌田恭史, 大友康平, 根本知己 |
| 2. 発表標題 多点走査型二光子顕微鏡を用いたマウス生体脳のin vivoイメージング |
| 3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 T. Kamada, K. Otomo, T. Murata, M. Hasebe, T. Nemoto |
| 2. 発表標題 Two-photon excitation spinning disk confocal microscopy utilizing two laser light sources |
| 3. 学会等名 The 19th RIES-Hokudai international symposium |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 A. Goto, K. Otomo, T. Nemoto |
| 2. 発表標題 High-Speed Polarization-Resolved Imaging of Living Mice Tissues by Two-Photon Excitation Multi-Point Scanning Microscopy |
| 3. 学会等名 The 19th RIES-Hokudai international symposium |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大友康平 |
| 2. 発表標題 二光子スピニングディスク共焦点顕微鏡の開発と多次元イメージングへの展開 |
| 3. 学会等名 多次元性細胞イメージング研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 K. Otomo, A. Goto, T. Nemoto |
| 2. 発表標題 Real-Time Polarization-Resolved Imaging of Living Mice Tissues by Two-Photon Excitation Spinning Disk Confocal Microscopy |
| 3. 学会等名 The 66th NIBB Conference / ABiS International Symposium（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 K. Otomo, T. Nemoto |
| 2. 発表標題 Improvements of two-photon microscopy for intravital micro/nano-imaging |
| 3. 学会等名 NIC@HU seminar "Technological developments of laser scanning fluorescence microscopy"（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 大友康平、根本知己 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 236 |
| 3. 書名 イメージングの選び方・使い方100+（編：原田 慶恵、永井 健治） | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | | |
|---------|---------------------|--|--|--|
| ベルギー | KU Leuven | | | |
| 米国 | Columbia University | | | |