

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 8月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21248040

研究課題名（和文）

非線形光学を用いた核および染色体の動態・構造解析

研究課題名（英文）

Structural elucidation of nucleus and chromosome using non-linear optical microscopy

研究代表者

福井 希一 (Kiichi Fukui)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：00311770

研究成果の概要（和文）：極短パルスレーザー照射により非線形光学効果で生じた微弱発光を検出し、対象物の構造のみならず対象物の分光学的性質を明らかにする、全く新しい光学理論に基づいた非線形光学顕微鏡、すなわち誘導ラマン散乱顕微鏡（SRS 顕微鏡）および、誘導パラメトリック発光顕微鏡（SPE 顕微鏡）を用いて、従来不可能であった染色体の完全無染色での三次元観察を行い、蛍光抗体や染色剤の影響をまったく受けない状態での染色体構造を可視化した。

研究成果の概要（英文）：Non-labeling and 3D visualization of nuclear and chromosomal structures were achieved by using newly developed non-linear optical microscopic techniques, such as Stimulated Raman Scattering (SRS) microscopy and Stimulated Parametric Emission (SPE) microscopy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2010年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2011年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2012年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
総計	27,400,000	8,220,000	35,620,000

研究分野：細胞動態学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：非線形光学顕微鏡；染色体観察；低侵襲無染色3次元観察

1. 研究開始当初の背景

細胞構造の解析研究は、高性能顕微法の進歩とともに進んできたといっても過言ではない。特に、共焦点レーザー顕微鏡は、蛍光標識した細胞内構造体やタンパク質の三次元観察を可能にし、細胞構造に関する多くの知見を与えた。一方で、共焦点レーザー顕微鏡では、対象物を蛍光物質による染色や蛍光タンパク質との融合などにより標識する必

要があり、標識物質が観察対象に与える影響を無視できない。したがって、観察結果がアーティファクトである可能性を完全に否定することは難しい。このような中、我々は極短パルスレーザー（フェムト秒レーザー）照射により対象物の電子状態を直接可視化する全く新しい非線形光学顕微鏡、すなわち誘導パラメトリック発光（SPE）顕微鏡と、分子振動情報を基に標的分子の可視化を行う

誘導ラマン散乱 (SRS) 顕微鏡を開発した。これらの顕微鏡は、生きた細胞あるいは細胞内小器官の、完全無染色で三次元観察を可能とする。このことから従来多くの研究にもかかわらず詳細が不明であった細胞分裂時における染色体の構造を知るという、最適の観察対象となると考えた。

2. 研究の目的

本研究では先に述べた稀有な特性を有する SPE 顕微鏡と、SRS 顕微鏡という 2 つの独自技術を用い、生体試料特に、細胞分裂過程の染色体の可視化を試み、本手法の有用性を示すと共に染色体構造に新たな知見を与えることを目的とした。

3. 研究の方法

2. の研究目標を達成するため、次の 2 点について主に実験を行った。

(1) 非線形光学顕微鏡を用いた、生細胞観察条件の検討

(2) 非線形光学顕微鏡を用いた、マグネシウムイオンによる染色体構造変化の観察

4. 研究成果

上記各実験に関する、結果と考察を以下に記す。

(1) 非線形光学顕微鏡を用いた、生細胞観察条件の検討

非線形光学顕微鏡を用いて生きた細胞の三次元動態解析を行うための観察条件、特にレーザーパワーについてタバコ BY-2 細胞を用いて検討した。その結果、2mW 以下の照射レーザーパワーでは、シグナル強度が弱く、シグナル取得に時間がかかるため、動態観察が難しいこと。5mW 以上では、観察に要する時間は短くなるが、細胞分裂の進行に遅れが見られ、20mW 以上では細胞分裂が正常に終了しないことが判った。そこで、顕微鏡の光学系を改良し、高感度化を図った。具体的には、装置に 4 f 光学系を加え、分散の影響を抑えるため新たな分散補償器を作成した。4 f 光学系は回折格子によりレーザーを各波長成分に分け、液晶空間光変調器により各成分の時間的分散を補正するもので、信号強度、ノイズの減少、コントラスト比の向上が期待される。その結果、これまで明瞭な像を得るためには 7mW 程度のレーザーパワーが必要であったものが、4mW でも十分に明瞭な像を得ることに成功した。

(2) これまでに行われた先行研究により、染色体サイズはマグネシウムイオン (Mg^{2+}) 濃度の上昇に伴って小さく、つまりは凝縮する

という知見が得られている。しかしこの先行研究では、染色体を DAPI により染色し、蛍光顕微鏡により観察を行っている。そのため、その染色剤のイオニックな影響や構造的影響の存在が考えられる。そこで本研究では、 Mg^{2+} の染色体構造に及ぼす影響を無染色で、SRS 顕微鏡を用いて観察することを目指した。染色体のラマンスペクトルにおいて、 1610 cm^{-1} にある程度強度の強いピークが存在し、このピークはタンパク質中の amide I と DNA のアデニンおよびグアニンに帰属される。そこでこのラマンシフトを用いて観察することで、染色体を無染色で可視化を試みた。本実験において染色体を観察するに当たり、バッファーを交換する操作を導入した。これにより同一試料における、 Mg^{2+} 濃度変化に伴う染色体サイズの連続的な変化を観察できるようにした。染色体試料としては、分裂期染色体数が少なく (メス $2n=6$ 、オス $2n=7$)、またそのサイズがヒトのものよりも非常に大きい (およそ 3 倍) Indian Muntjac (ホエジカ) のスライドガラス上への展開染色体を用いた。

その結果、図 1 に示すように、SRS 顕微鏡を用いて、無染色にて高コントラストのイメージが得られることが示された。

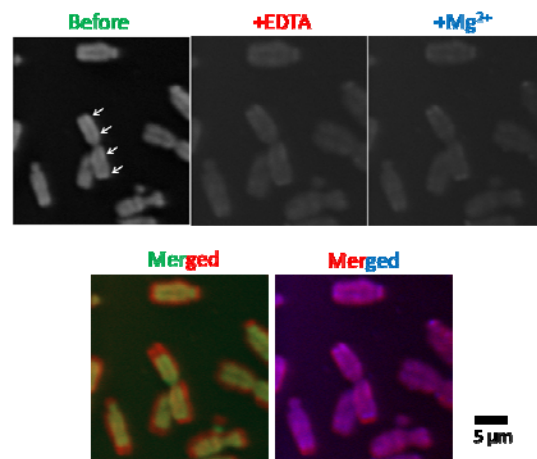


図 1. 無染色の Indian Muntjac 展開染色体標本の SRS イメージ。ラマンシフト： 1610 cm^{-1} (DNA およびタンパク質)。(上段) 左から初期条件 (2 mM $MgCl_2/XBE$)、EDTA 処理後、 Mg^{2+} 添加後。(下段左) 初期条件と EDTA 処理後の重ね合わせ。(下段右) EDTA 処理後と Mg^{2+} 添加後の重ね合わせ。染色体の一部において比較的強いシグナルが検出された (矢印部位)。スケールバー： $5\text{ }\mu\text{m}$

また、染色体のテロメア周辺およびセントロメア周辺の部位から強いシグナルが検出され、テロメアとセントロメアの領域には、ヘテロクロマチンが高度に凝縮している部位が存在することが示唆された。続いてこの染色体に対して 50 mM EDTA/XBE へのバッフ

アー交換を行い観察し、さらに 50 mM MgCl₂/XBE に交換し観察した。この結果から、染色体が EDTA 処理によって大きく脱凝縮し、Mg²⁺添加によって再凝縮していることが示された。次に初期条件、EDTA 処理後、Mg²⁺添加後それぞれでの染色体において、SRS 顕微鏡で観察し、その幅を計測した。その際の計測部位は、セントロメア、短腕側と長腕側両方のテロメア付近、短腕と長腕の中間部とした。セントロメア周辺とテロメア周辺でのシグナルが強かったことから、このシグナルが強い部分と弱い部分の境目を各領域の境界線として仮定し、測定を行った (図 2)。

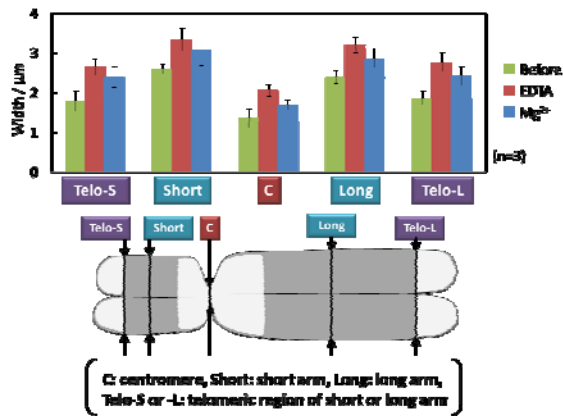


図 2. SRS 顕微鏡観察における Mg²⁺濃度変化による染色体各部位のサイズ変化。「Before」は初期条件を示す。

この計測の結果、各部位で脱凝縮と再凝縮の様子が明瞭に示された。これまでの研究から、Mg²⁺はクロマチンの中でもヘテロクロマチン部位の凝縮に特に影響している知見が得られている。本研究で得られた結果において、染色体構造において腕部の中間領域よりもテロメア領域およびセントロメア付近の方が Mg²⁺濃度変化に伴う構造変化が大きかったことから、Mg²⁺は特にヘテロクロマチン領域の凝縮に影響を及ぼすということが確認された。本実験では、比較として、染色体を蛍光色素 (Hoechst 33342) によって染色し、蛍光顕微鏡により同様の観察を行ったが、この場合、染色体全体を通じて脱凝縮・再凝縮の割合がとても小さく、明瞭な差を見ることができなかった。これは、この蛍光色素は三価の陽イオンとして溶液中では存在し、ATリッチな DNA 領域へ選択的に結合するため、染色体の凝縮に大きな影響を与えたものと考えられる。この結果を考察すると、従来から懸念されてきたように、蛍光染色による観察試料への影響 (アーティファクト) が非常に大きい可能性が示唆された。またこのような結果から、本研究で用いた SRS 顕微鏡のような試料を無染色観察できる顕微鏡技術は、これからの生命科学研究のさらなる発展に

は不可欠なツールであると結論できる。

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 13 件)

Ishii M., Uchiyama S., Ozeki Y., Kajiyama S., Itoh, K. and Fukui K., Visualization of Oil Body Distribution in *Jatropha curcas* L. by Four-Wave Mixing Microscopy, *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol 52, 査読有, (2013), 062403-062407

Nose K., Ozeki Y., Kishi T., Sumimura K., Nishizawa N., Fukui K., Kanematsu Y., and Itoh K., Sensitivity enhancement of fiber-laser-based stimulated Raman scattering microscopy by collinear balanced detection technique, *Optics Express*, Vol. 20, 査読有, (2012), 13958-13965.

Ozeki Y., Umemura W., Otsuka Y., Satoh S., Hashimoto H., Sumimura K., Nishizawa N., Fukui K. and Itoh K., High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering, *Nature Photonics*, Vol.6, 査読有, (2012), 845-851.

Ozeki Y., Umemura W., Sumimura K., Nishizawa N., Fukui K., and Itoh K., Stimulated Raman hyperspectral imaging based on spectral filtering of broadband laser pulses, *Optics Letters*, Vol. 37, 査読有, (2012), 431-433.

Umemura W., Fujita K., Ozeki Y., Goto K., Sumimura K., Nishizawa N., Fukui K., Itoh K., Subharmonic Synchronization of Picosecond Yb Fiber Laser to Picosecond Ti:Sapphire Laser for Stimulated Raman Scattering Microscopy, *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol. 51, 査読有, (2012), 022702-022705.

Hayashihara K., Uchiyama S., Shimamoto S., Kobayashi S., Tomschik M., Wakamatsu H., No D., Sugahara H., Hori N., Noda M., Ohkubo T., Zlatanova J., Matsunaga S. and Fukui K., The middle region of an HP1-binding protein, HP1-BP74, associates with linker DNA at the entry/exit site of nucleosomal DNA, *J. Biol. Chem.*, Vol. 285, 査読有, (2010), 6498-6507.

Ozeki Y. and Itoh K., Stimulated Raman scattering microscopy for live cell imaging with high contrast and high

sensitivity, Laser Phys., Vol. 20, 査読有, (2010), 1114-1118

Yamagiwa M., Omura G., Ozeki Y., Ishii M., H. M. Dang, Kajiyama S., Suzuki T., Fukui K., and Itoh K., Dual-Band Stimulated Parametric Emission Microscopy, Jpn. J. Appl. Phys., Vol. 49, 査読有, (2010), 16603-16606.

H. M. Dang, Kawasumi T., Omura G., Umamo T., Kajiyama S., Ozeki Y., Itoh K., and Fukui K., Three-Dimensional Unstained Live-Cell Imaging Using Stimulated Parametric Emission Microscopy, Jpn. J. Appl. Phys., Vol.48, 査読有, (2010), 97003-97007.

H. M. Dang, Omura G., Umamo T., Yamagiwa M., Kajiyama S., Ozeki Y., Itoh K., Fukui K., Label-free imaging by stimulated parametric emission microscopy reveals a difference in hemoglobin distribution between live and fixed erythrocytes, J. Biomed. Opt., Vol.14, 査読有, (2009), 040506-040508

[学会発表] (計 35 件)

①Ozeki Y., Otsuka Y., Sato S., Hashimoto H., Umemura W., Sumimura K., Nishizawa N., Fukui K., and Itoh K., Label-free observation of tissues by high-speed stimulated Raman spectral microscopy and independent component analysis, Photonics West 2013, Feb. 3rd, 2013, San Francisco.

②Wataru Umemura, Yasuyuki Ozeki, Kenta Fujita, Kazuhiko Sumimura, Norihiko Nishizawa, Kiichi Fukui, Kazuyoshi Itoh High-Speed Molecular Spectral Imaging by Stimulated Raman Scattering Microscopy Using Wavelength-Tunable Pulses, CLEO 2012, May 9th, 2012, San Jose.

③小関泰之、誘導ラマン散乱を用いた無染色生体顕微鏡、第 50 回 光波センシング技術研究会、2012.12.5、東京理科大学

④小関泰之、誘導ラマン散乱による生体イメージングの実証とその高感度化、春季 第 58 回 応用物理学関係連合講演会、2011 年 3 月 24 日 神奈川工科大学

⑤梅村航、小関泰之、藤田健太、住村和彦、西澤典彦、福井希一、伊東一良、誘導ラマン散乱顕微鏡による高速分光イメージング、第 59 回応用物理学関係連合講演会、2011 年 3

月 15 日、早稲田大学

⑥小関泰之、北川雄真、梅村航、住村和彦、西澤典彦、梶山慎一郎、福井希一、伊東一良、高調波同期した 2 波長光源による誘導ラマン散乱顕微鏡の高感度化、第 5 回超高速光エレクトロニクス研究会、2010 年 8 月 20 日、慶応大学日吉キャンパス

⑦Ozeki Y. and Itoh K., Stimulated Raman scattering microscopy for live-cell imaging with high contrast and high sensitivity, 18th International Laser Physics Workshop (LPHYS' 09), July 16th, 2009, Barcelona, Spain.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：光学顕微鏡、および光学計測
発明者：小関 泰之、伊東 一良、嶽 文宏、福井 希一、梶山 慎一郎、北川 雄真、西澤 典彦、住村 和彦
権利者：キヤノン株式会社
種類：特許
番号：PCT/J P 2 0 1 0 / 0 5 9 3 2 7
出願年月日：平成 2 2 年 6 月 2 日
国内外の別：PCT

[その他]

ホームページ等
<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/cl/top.php>

日刊工業新聞、2009 年 6 月 8 日「SRS 顕微鏡を開発 生きた細胞 3 次元観察」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 希一 (FUKUI KIICHI)
大阪大学・工学研究科・教授
研究者番号：00311770

(2) 研究分担者

小関 泰之 (OZEKI YASUYUKI)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：60437374
伊東 一良 (ITO KAZUYOSHI)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：80113520
内山 進 (UCHIYAMA SUSUMU)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：90335381

(3) 連携研究者
該当無し。