

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19346

研究課題名（和文）変性タンパク質の高次構造をin vivo可視化する三次元分子配向イメージング

研究課題名（英文）3D molecular orientation imaging for in vivo visualizations of denatured proteins

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題は、生きた細胞中の生体分子の局在と高次構造の同時可視化という前人未踏のイメージングを達成する新規三次元分子配向イメージング法を樹立することを目的とした。このために、偏光異方性解析、超解像顕微鏡技術等を応用した新規二光子顕微鏡システムの開発を実施した。蛍光ビーズや脂質膜標識リボソーム等の光学ファントムを用いた原理検証実験に成功し、現在、継続的に生細胞を用いた実験に取り組んでいるので、いずれ成果として報告したい。また、研究の過程で付随的な要素技術開発に成功し、そのうち幾つかを原著論文として報告するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体は分子、細胞小器官、細胞、組織の多階層において精微な三次元構造を持ち、この多階層における様々な『かたち』は機能と密接な関わりを持つ。これを理解するイメージング技術の発展は目覚ましく、各階層における現象の詳細記述が可能になりつつある。一方で、個々の方法論には、原理に応じた限界が存在し、階層間の相互理解の妨げとなっている。本研究課題は組織から細胞小器官までを主対象とする蛍光顕微鏡法にて、分子のかたちの可視化する基盤技術の開発に挑んだ。本技術成熟の暁には、生体を構成する多階層構造の縦断的理解が可能となり、生命科学研究における多大なインパクトが期待される。

研究成果の概要（英文）：The objective of this research project is to establish a novel three-dimensional molecular orientation imaging method to realize simultaneous visualization of localization and higher-order structure of biomolecules. To achieve it, a novel two-photon microscopy system based on polarization anisotropy analysis and super-resolution microscopy techniques was developed. Proof-of-principle experiments using optical phantoms such as fluorescent beads and fluorophore-labeled liposomes, have established the technical basis for higher-order structural imaging of biomolecules. Experiments using living cells are currently in progress and results will be reported in due course. In the course of our research, we have also succeeded in developing auxiliary elemental technologies, some of which were reported as the original papers.

研究分野：物理薬学

キーワード：二光子顕微鏡法 超解像顕微鏡法 分子配向イメージング 高次構造 偏光イメージング 一分子イメージング

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

研究開始当初において、研究代表者は二光子励起蛍光顕微鏡法の技術開発研究に取り組んでいた。本法は、近赤外域の超短光パルスを励起に用いる原理に由来して、低侵襲性、深部可視化能を両立する。このことから、可視光による一光子励起顕微鏡法が適用困難な、生体の臓器、厚組織切片の観察に汎用されている。その深部可視化能は PET 法、核磁気共鳴画像法、発光イメージング法に劣るものの、細胞小器官レベルの空間分解能、ミリ秒から秒の時間分解能を有する点に優位性がある。一方で、細胞内にズームインすると、その素過程の主役はタンパク質等の生体分子である。これらの高次構造の可視化については、蛍光イメージング法の空間分解能は及ばない。生体分子の高次構造解析には、古くから構造生物学的手法が実施されてきたが、本手法は原理的に生きた標本中の対象に適用ができない。つまり、生体分子の高次構造を *in vivo* で追跡するイメージング手法は存在していなかった。

2. 研究の目的

本研究課題は、生きた細胞中の生体分子の局在と高次構造の同時可視化という前人未踏のイメージングを達成する新規蛍光顕微鏡法を樹立することを目的とした。このために、研究代表者が取り組んできた二光子顕微鏡技術を基盤とし、偏光異方性解析、超解像顕微技術等を応用した新規三次元分子配向イメージング法の開発を目指した。

3. 研究の方法

まず、研究代表者が取り組んできた二次元分子配向イメージング法の超解像化のために、(1) 誘導放出制御 (STED) 法を応用した二光子超解像顕微鏡法の技術深化、(2) 一分子局在化法と偏光異方性解析を融合した新規顕微鏡システムの構築を行った。さらに、三次元分子配向イメージングへの拡張を鑑み、(3) 二光子スピニングディスク共焦点顕微鏡法の多チャンネル化、体積イメージング技術導入、(4) 光波面制御技術開発を実施した。蛍光ビーズや脂質膜標識リポソーム等の光学ファントムを用いた原理検証実験を行うとともに、様々な派生技術を生体イメージングに応用した。

4. 研究成果

研究代表者が初年度に自然科学研究機構 生命創成探究センターから順天堂大学 大学院医学研究科に移動したことや、コロナ禍における備品の納期遅延に伴い、研究期間を当初の予定の二年間から三年間に延長した。この延長により、主目的である生体分子の高次構造イメージングの技術基盤を樹立することができた。さらに、研究の過程で付随的な要素技術開発に成功し、そのうち幾つかを原著論文として報告するに至った。

(1) 二光子 STED 顕微鏡法

研究代表者はこれまでに、STED 顕微鏡法を応用した二光子超解像顕微鏡法の技術開発を行ってきた (Otomo *et al.*, *Opt. Express* 2014; Otomo *et al.*, *Biomed. Opt. Express* 2018; Ishii *et al.*, *Biomed. Opt. Express* 2019)。本研究課題においては、蛍光検出光学系にサブナノ秒精度の時間ゲート検出機構の導入を行なった。これにより、自家蛍光成分および誘導放出効果により蛍光寿命が実質的に短縮した蛍光成分を効率よく除去し、空間分解能の更なる向上に成功した。本成果は原著論文として報告した (図 1; Ishii *et al.*, *PLOS ONE* 2023)。

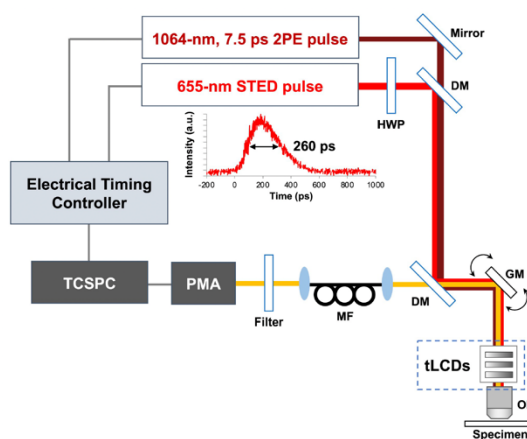


図 1. 時間ゲート検出光学系を実装した二光子 STED 顕微鏡システム

(2) 一分子局在化法と偏光異方性解析の融合

研究代表者は、二光子顕微鏡で取得できる蛍光信号や、第二次高調波発生信号を *s* 偏光、*p* 偏光に成分分解して検出器に導き、その信号強度比を解析することにより、生きた動物の内部における二次元分子配向イメージングに成功した (Goto *et al.*, *Front. Phys.* 2019)。本研究課題においては、同一イメージングによってタンパク質の高次構造の可視化することを目指し、一分子局在化法の導入を行った。具体的には、明滅する一分子の蛍光発色団に由来する信号を偏光分解検出できる光学系を構築した。光学ファントムによる原理検証を終え、現在、継続的に生細胞を用いた実験に取り組んでいるので、いずれ成果として報告したい。

(3) 二光子スピニングディスク共焦点顕微鏡法

研究代表者はこれまでに、スピニングディスク多点走査方式を応用した高速二光子顕微鏡法の技術開発を行ってきた (Otomo *et al.*, *Anal. Sci.* 2015; Otomo *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020)。本研究課題においては、三次元生体における多分子間相互作用を高速検出するために、多チャンネル化と体積イメージング技術導入を行なった。前者については、二種類の励起レーザー光パルスの交互照射光学系と蛍光分光検出光学系、線形アンミキシング法を応用することにより、4チャンネルの三次元タイムラプス撮像を可能とした。本法を動物・植物培養細胞の有糸分裂過程の追跡に応用し、低侵襲的な可視化解析が可能であることを実証した。本成果は原著論文として報告した (図 2; Kamada *et al.* *Sci. Rep.* 2022)。後者については、電気式焦点可変レンズを導入することで、高速の多焦点蛍光画像取得を可能とした。本成果は原著論文として報告した (Ataka *et al.* *Biomed. Opt. Express* 2024)。

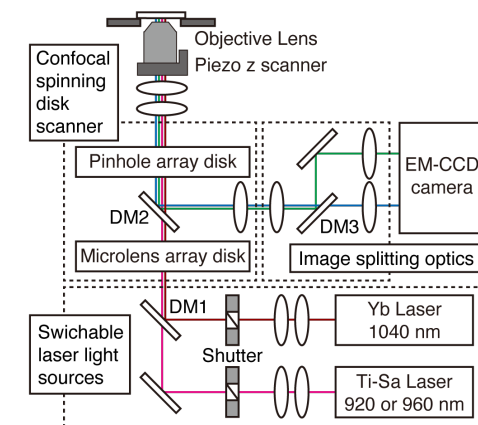


図 2. 二光子スピニングディスク共焦点顕微鏡システムの高チャンネル化

(4) 光波面制御技術開発

これまでに独自開発を報告してきた透過型液晶素子に加え、反射型の空間光位相変調器、アキシコンレンズ等を援用し、二光子励起光の波面制御技術開発を実施した。この中で、集光スポットにおいて光軸方向に強い電場を持つ径偏光ビームを生成させることで三次元分子配向イメージングに有用であることの原理検証実験に成功した。このことから、本技術を (1)、(2) の項目と融合させることにより、生体分子の高次構造イメージングへの展開を実施中である。また、アキシコンレンズを用いた新規光ニードル生成デバイスの開発に成功した。本デバイスは、既存の二光子顕微鏡システムのフィルターターレットに挿入するのみで、200 μm の焦点深度の体積イメージングの実現が可能であった。本成果は原著論文として報告した (図 3; Chang *et al.* *Sci. Rep.* 2022)。

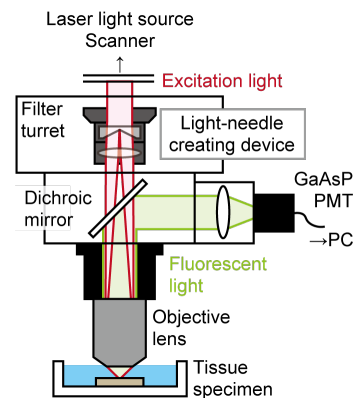


図 3. アドオンデバイスによる光ニードル二光子顕微鏡システム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Takahashi Taiga, Zhang Hong, Agetsuma Masakazu, Nabekura Junichi, Otomo Kohei, Okamura Yosuke, Nemoto Tomomi	4. 巻 7
2. 論文標題 Large-scale cranial window for in vivo mouse brain imaging utilizing fluoropolymer nanosheet and light-curable resin	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 232-1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-024-05865-8	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 Ataka Mitsutoshi, Otomo Kohei, Enoki Ryosuke, Ishii Hirokazu, Tsutsumi Motosuke, Kozawa Yuichi, Sato Shunichi, Nemoto Tomomi	4. 巻 15
2. 論文標題 Multibeam continuous axial scanning two-photon microscopy for in vivo volumetric imaging in mouse brain	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 1089 ~ 1101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/boe.514826	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, Chang Ching-Pu, Yamasaki Miwako, Watanabe Masahiko, Yokoyama Hiroyuki, Nemoto Tomomi	4. 巻 18
2. 論文標題 All-synchronized picosecond pulses and time-gated detection improve the spatial resolution of two-photon STED microscopy in brain tissue imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0290550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0290550	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, Ishii Hirokazu, Nemoto Tomomi	4. 巻 20
2. 論文標題 Improving two-photon excitation microscopy for sharper and faster biological imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e20009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v20.0009	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 Ramon Avena Francisco, Wada Yuki, Ishii Hirokazu, Watakabe Yuki, Tsutsumi Motosuke, Jang Kwangkyun, Otomo Kohei, Qiao Lin, Fujii Yuki, Tsujino Hirofumi, Tsutsumi Yasuo, Nemoto Tomomi, Arisawa Mitsuhiro	4. 巻 212
2. 論文標題 Absorption, fluorescence, and two-photon excitation ability of 5-phenyl-13-arylisoindololo[2,1-a]quinolines prepared by one-pot reaction of ring-closing metathesis and 1,3-dipolar cycloaddition	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Dyes and Pigments	6. 最初と最後の頁 111118 ~ 111118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dyepig.2023.111118	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 Chang Ching-Pu, Otomo Kohei, Kozawa Yuichi, Ishii Hirokazu, Yamasaki Miwako, Watanabe Masahiko, Sato Shunichi, Enoki Ryosuke, Nemoto Tomomi	4. 巻 12
2. 論文標題 Single-scan volumetric imaging throughout thick tissue specimens by one-touch installable light-needle creating device	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10468 ~ 10468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-14647-3	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, Takahashi Taiga, Yamaguchi Kazushi, Nemoto Tomomi	4. 巻 179
2. 論文標題 Focusing new light on brain functions: multiphoton microscopy for deep and super-resolution imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 24 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.11.011	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, 石井宏和, 根本知己	4. 巻 72
2. 論文標題 多次元生体イメージングを実現する二光子顕微技術開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 分光研究	6. 最初と最後の頁 30-39
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 Kamada Takafumi, Otomo Kohei, Murata Takashi, Nakata Kaito, Hiruma Shota, Uehara Ryota, Hasebe Mitsuyasu, Nemoto Tomomi	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 809-1-10
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、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、野中茂紀、亀井保博	4. 巻 40
2. 論文標題 何ができる？ どこで使える？ 先端蛍光顕微鏡つかい分けガイド	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 67 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18958/6941-00002-0000019-00	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 根本知己、大友康平、高橋泰伽、山口和志	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 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 -

[学会発表] 計16件(うち招待講演 9件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hirokazu Ishii, Joe Sakamoto, Kohei Otomo, Tomomi Nemoto
2. 発表標題 All-pulsed two-photon STED microscopy for brain tissue nanoimaging
3. 学会等名 Focus On Microscopy 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kohei Otomo
2. 発表標題 High speed/throughput bioimaging utilizing novel volumetric fluorescence microscopy
3. 学会等名 Neurolunch; Colombia Univ. Biological Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kohei Otomo
2. 発表標題 Novel volumetric fluorescence microscopy for high speed/throughput imaging
3. 学会等名 Retreat for Multidimensional Analysis of Memory Mechanisms (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大友康平
2. 発表標題 生体の多階層構造を捉える光学断層蛍光イメージング技術開発
3. 学会等名 生理研研究会 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 2022年

1. 発表者名 大友康平、根本知己
2. 発表標題 多光子顕微鏡法の高度化～北大電子研での研究とその後
3. 学会等名 北海道大学ニコイメーjingセンター学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大友康平
2. 発表標題 ユーザーアフォーダブルな小型光シート顕微鏡によるデスクサイド三次元組織観察
3. 学会等名 光シート顕微鏡ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野沢裕貴，大友康平，斎藤友里，渡我部ゆき，根本知己，洲崎悦生
2. 発表標題 descSPIM：ユーザーアフォーダブルな透明化組織用小型光シート顕微鏡
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大友康平
2. 発表標題 生体内 3D構造の縦断可視化に向けた蛍光顕微技術開発
3. 学会等名 第 14 回「光塾」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大友康平、洲崎悦生
2. 発表標題 デスクサイド三次元組織観察を実現する小型光シート顕微鏡
3. 学会等名 ゲノム再生医療センター研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大友康平
2. 発表標題 Multidimensional intravital imaging based on novel multi-photon microscopic technologies
3. 学会等名 第 100 回日本生理学会大会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大友康平
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 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」
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 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, 根本知己
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 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 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

〔図書〕 計0件

〔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		
中国	Tianjin Univeristy		