

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25650052

研究課題名(和文)化学発光における光学断層像計測顕微鏡の開発

研究課題名(英文)Development of the microscopy for optical sectioning chemiluminescence imaging

研究代表者

新井 由之(Arai, Yoshiyuki)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：20444515

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)：化学発光イメージングは、化学発光タンパク質が発光基質を代謝することによる発光を利用した方法である。励起光が不要であるが、照明光学系を利用した3次元イメージングを行うことはできなかった。そこで、レンズの球面収差を利用した化学発光3次元イメージングを可能とする顕微鏡の開発を行った。その結果、化学発光イメージングにおいて3次元像の取得はできなかったが、他のイメージング法への応用可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Chemiluminescence imaging enable us excitation light free imaging since the chemiluminescent probes can emit the light by the reaction with the chemiluminescent substrates. However, three dimensional imaging cannot be done because the system do not use illumination optical system. Here I develop the microscopy by utilizing the spherical aberration of the optical lens for three dimensional chemiluminescence imaging. Although my system could not be used for the extraction of optical plane of chemiluminescence image, the system might have the possibility for other fluorescence imaging system.

研究分野：生物物理学

キーワード：イメージング

1. 研究開始当初の背景

化学発光イメージングは、化学発光タンパク質が発光基質を代謝することによる発光を利用したイメージング法である。励起光を利用した蛍光イメージングに比べ、光毒性の影響がなく、また細胞に損傷を与えることが可能な光遺伝学ツールとの併用が可能であるといった利点がある。さらに、励起光が不要であるため、生体深部のイメージングにも強い。従来の化学発光タンパク質は、発光強度が低いために、長時間露光を必要するため、蛍光観察に比べてダイナミクスの計測は不向きであった。しかしながら、最近開発されてきた NanoLantern シリーズ (Saito et al., 2012, Nat. Commun, Suzuki et al., 2016, Nat. Commun.) や NanoLuc (Hall et al., 2012, ACS Chem. Biol.) といった高光度化学発光タンパク質により、実時間でのイメージングが十分行えるようになってきた。他方、励起光を必要としないことから、共焦点レーザー顕微鏡のような、照明光学系を利用した 3 次元イメージングや、光の回折限界を超えた計測法である超解像計測といった手法を用いることができない問題点があった。

顕微鏡を用いた細胞イメージングでは、明るく・高空間分解能を取得するために、開口数の大きな油浸対物レンズを用いることが多い。細胞など水溶液中の試料を油浸対物レンズで観察する際、オイルの屈折率 (1.51) と水溶液や細胞の屈折率 (1.33 および 1.38)

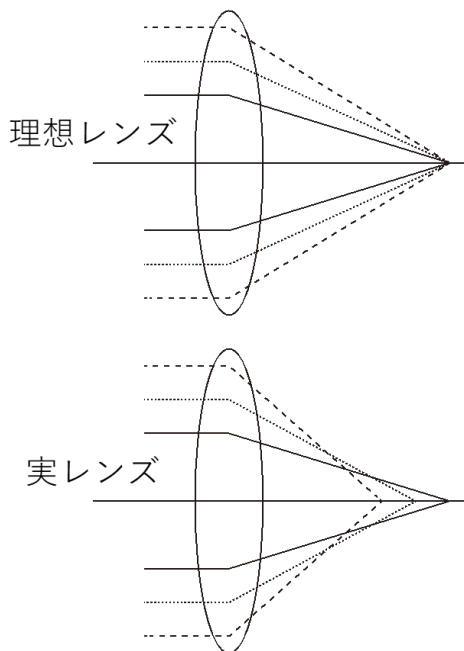


図1 球面収差の模式図 理想的なレンズでは、光軸の高さによらず焦点位置は一定だが、実レンズでは球面収差のためにずれる

が異なるため、球面収差が生じる (図1)。球面収差は、光軸近傍の光線による焦点位置と、光軸から外れた高さの光線の焦点位置が異なる現象であり、像のボケの主要因である。しかしながら、球面収差では、光線の高さによって焦点位置が異なることから、特定の光線のみを取り出すことができれば、特定の光学切片のみの像を形成することが可能であると考えた (図2)。球面収差は照明光学系によらないため、化学発光イメージングにおいても利用することが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

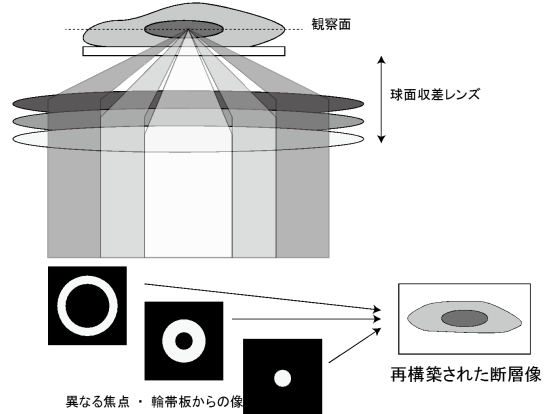


図2 本研究の模式図 球面収差のある対物レンズからの像を、輪帯板を通して計測し選択的に特定の光学切片上の画像のみを取得することで、3次元像の構築を行う。

本研究では、通常イメージングにおいてはボケの主要因となり忌避される球面収差を利用して、化学発光イメージングにおける 3 次元計測を可能とすることを目的とした。

3. 研究の方法

球面収差は、その高さに応じて焦点位置が異なる (図1)。そこで、ガラス基板にパターンすることにより輪帯板を作成し、特定の高さの光線のみを透過させることとした。輪帯の大きさは、使用する対物レンズおよびリレー光学系に基づき設計した。輪帯板を組み込むための光学系の模式図を示す (図3)。倒立顕微鏡のカメラポートからの像を、リレーレンズにより一旦平行光にした。フーリエ面に輪帯板を置くことで特定の高さの光線のみを通過させ、再度レンズによりカメラ上に結像させた。対物レンズは 60 倍油浸対物レンズ (NA1.40) を用いた。

4. 研究成果

4 - 1. 輪帯板通過後の蛍光ビーズ像

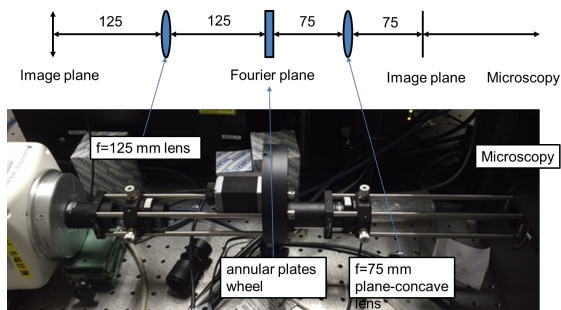


図3 光学系の模式図 顕微鏡により形成された像を一旦レンズにより平行光とする。レンズのフーリエ面に、輪帯板(電動フィルターホイールにより制御)を置き、光線を選択する。輪帯板を通過した光は、再度レンズによりカメラ上に結像される。

構築した光学系による像の見え方を検証するために、アガロースゲル中に包埋した 0.2 μm 径の蛍光ビーズを観察し、3次元像の取得を行った。その結果、輪帯板を使わない場合に比べ、高開口数成分のみを通す輪帯板を利用した場合では、点像分布関数が光軸方向に細長くなった。これは、輪帯板により光軸近傍の光線がカットされたことにより、本来であれば打ち消しあはずの光線が存在することによる効果と考えられる (Oketani et al., 2017, Optics letters)。また、Z 軸方

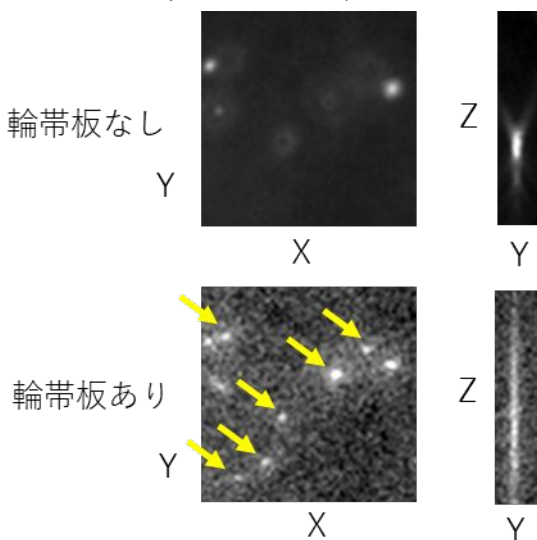


図4 蛍光ビーズの観察像 輪帯板がない場合は、焦点面のビーズ以外はデフォーカスされた像となっている。一方、輪帯板を挿入した場合、焦点外のビーズも輝点として確認することができる(矢印)。点像分布関数をみると Z 軸方向に大きく伸びている様子がわかる。

向の点像分布関数を確認すると、焦点外の YZ 方向に広がった(ぼけた)画像が除去されていることがわかった。このことは、輪帯板を光が通過することにより、焦点外からの光を

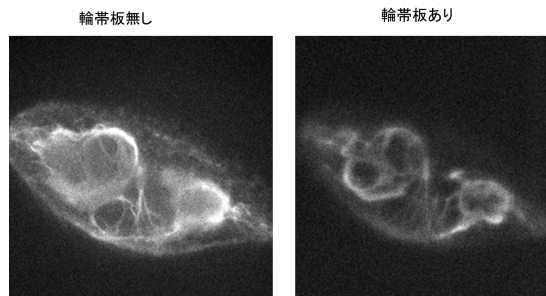
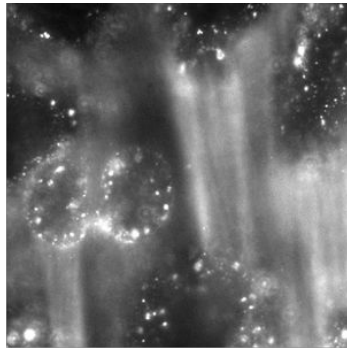


図5 化学発光イメージング 輪帯板がある場合、若干の解像度の劣化が見られた。一方、輪帯板がない状態での像と比較すると、フォーカス面以外の構造物も見ることができた。しかしながら、Z 軸方向にステージを動かしても、像に変化はなかった。

カットしているためと考えられる。次に、本光学系を用いて、化学発光タンパク質のイメージングを試みた。化学発光タンパク質 GenL ビメンチンを発現する HeLa 細胞に、発光基質を加えて化学発光イメージングを行った(図5)。輪帯板を通して観察した像は、輪帯板無しの像に比べて XY 方向の解像度がやや劣化していた。一方、興味深いことに、輪帯板がない通常の像では、フォーカス面以外の画像はぼけているが、輪帯板がある状態では、焦点外の構造物も観察することができた。さらに、Z 軸の位置を変更しても、観察される像に大きな変化は見られなかった。このことは、先ほどのビーズによる計測と一致している。すなわち、Z 軸方向の点像分布関数が伸びたために、得られた像も Z 軸方向に伸びた像となったためと考えられる。本研究の当初の目的では、輪帯板を利用することにより特定の高さの光軸成分のみ取り出すことで、3次元像の取得を目的としていたが、本方法では難しいことが明らかとなった。

高開口数の対物レンズ利用時は、焦点深度が浅いために限られた焦点内のシグナルのみフォーカスを合わせて検出するため、Z 軸方向に分布するシグナルを取得するためには、Z 軸方向をスキャンする必要がある。一方、本方法を用いることにより Z 軸方向の数 μm オーダーの蛍光・発光シグナルを一度に取得することが可能であることが示唆された。そこで、倒立顕微鏡に 1 分子蛍光観察用の光学系を組み込み、蛍光標識した上皮成長因子 (EGF) を添加し、1 分子計測を行った(図6) その結果、輪帯板を含まない、通常の像では、焦点から外れた 1 分子の蛍光を観察することはできなかった。一方、輪帯板を通過させて像計測を行った場合、焦点外の 1 分子蛍光シ

輪帯板なし



輪帯板あり

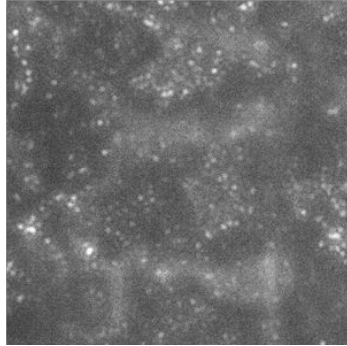


図6 蛍光1分子イメージング 全反射照明
蛍光顕微鏡により、テトラメチルローダミン
標識されたEGF分子とHeLa細胞との膜上
での結合を観察した。輪帯板がない場
合、1分子の輝点は観察面(ガラス底面)
のみで観察され、焦点外の輝点はボケに
より観測できない。一方、輪帯板を通した
場合、蛍光強度の減少および、輝点の大
きさの拡大といった点が見られたが、焦点
外から蛍光の輝点もとらえていた。

グナルをとらえることができた。本結果は、
近年行われるようになってきた、1分子レベ
ルでの細胞内タンパク質の発現量の定量解
析を迅速に行うことができるツールとして
有用であると考えられる。

化学発光イメージングは、プローブの発光
強度の改良に伴い、蛍光イメージングに比べ
ても遜色ない実時間イメージングが可能と
なってきた。そのため、化学発光3次元計測
の試みが行われてきている。化学発光プロー
ブあるいは光学系の改良により、3次元計測
が行われることが期待される。

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 3件)

1. Inagaki S., Suzuki K., Agetsuma M.,
Arai Y., Jinno Y., Bai G., Daniels MJ.,
Okamura Y., Matsuda T., Nagai T.,

(2016). Genetically encoded
bioluminescent voltage indicator for
multi-purpose use in wide range of
bioimaging. Sci. Rep., 7, 42398

2. Suzuki M., Kimura T., Shinoda H., Bai
G., Daniels MJ., Arai Y., Nakano M.,
Nagai T. (2016). Five colour variants of
bright luminescent protein for
real-time multicolour bioimaging. Nat
Commun., 7, 13718
3. Arai Y., Nagai T., (2014) Document
Real-time chemiluminescence imaging
using nano-lantern probes. Curr pro
chem biol, 6, 221-236

[学会発表](計 1件)

新井由之(2017) 収差を利用した化学発光
3次元イメージング法の開発. 第8回定量生
物学会年会(2017.01.08-2017.01.09 於岡崎
カンファレンスセンター)

6. 研究組織

(1)研究代表者

新井 由之 (ARAI, Yoshiyuki)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号: 20444515