

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840044

研究課題名(和文)多光子励起光活性化法を利用した生体深部の単一細胞内cAMP濃度制御手法の開発

研究課題名(英文)Improvement of multi-photon excitation microscopy for controlling single cell cAMP level in deep tissue

研究代表者

大友 康平(Otomo, Kohei)

北海道大学・電子科学研究所・特任助教

研究者番号：40547204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、オプトジェネティクス研究において有用な新規方法論を、生体深部可視化手法である多光子顕微鏡法をベースとして確立することを目的とした。具体的には、生体深部における三次元的局所光刺激により細胞内二次伝達物質濃度を制御し、その変化を高時間分解能で可視化できる多光子顕微鏡法の開発を目指した。その結果、多光子励起光の多点走査による高時間分解能イメージング、多光子光刺激を同時に行える顕微鏡の開発に成功した。さらに、誘導放出制御法の適用により、多光子顕微鏡の超解像化に成功した。現在、構築した顕微鏡システムを用い、生体内における二次伝達物質濃度の局所制御実験に取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：The research goal was to develop new multi-photon excitation fluorescence microscopy systems which are beneficial for optogenetics studies. Specifically, we aimed to develop a microscopy system that enables light activation control of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) level in the single cell locating at the deep region of a live specimen, and visualization of the changes of cAMP level at the high spatiotemporal resolution. By utilizing a multipoint laser scanning method, development of a microscopy system that enables the high temporal resolution multi-photon excitation fluorescence imaging and the locally multi-photon activation was achieved. Furthermore, by utilizing a stimulated emission depletion process, a new two-photon excitation super-resolution microscopy technique was developed. At present, we approach to locally cAMP control in a live specimen by use of developed microscopy systems.

研究分野：生物物理学

キーワード：多光子顕微鏡 超解像顕微鏡 光遺伝学

### 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、オプトジェネティクスは新規研究手法として注目をあびていた。本手法においては、まず、光刺激により活性化し、機能を呈するタンパク質を生体試料に遺伝子工学的に導入する。その後、生体試料に対して光刺激を与え、タンパク質の機能を促すことで、光による生体内現象制御を実現する。Nature Methods 誌は本分野を Method of the year 2010 に選定し、2011 年 1 月に特集を掲載した。このことが象徴する通り、当時から、国内外において非常に注目度が高い方法論であった。

### 2. 研究の目的

本研究は、オプトジェネティクス領域において、多光子顕微鏡法をベースとした新規方法論を確立することを目的とした。多光子励起顕微鏡法は深部到達性、低侵襲性、励起の局所性を有することから、*in vivo* イメージング等の生体内可視化分析における代表的な手法として、当時から広く用いられていた。対象タンパク質としては、青色光により活性化するアデニル酸シクラーゼ (PAC) に着目した。PAC を発現した単一細胞に対し、多光子励起による三次元的局所光刺激を行い、細胞内二次伝達物質である環状 AMP (cAMP) 濃度を制御し、その濃度変化を高速で多光子励起イメージングできる顕微鏡法を開発することで、生体深部における cAMP 濃度の単一細胞レベルでの光制御と可視化の同時実現を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規レーザー走査型顕微鏡の開発

##### 多点走査型多光子顕微鏡

スピニングディスク方式多点走査型スキャナ、多光子励起光源として ytterbium (Yb) レーザー、多光子光刺激光源としてチタンサファイア (Ti-Sa) レーザー、分光型の検知光学系を組み合わせることで、高速の多光子励起イメージングと多光子光刺激を同時に行える顕微鏡システムを構築した。

##### 超解像多光子顕微鏡

透過型液晶デバイスを用いて生成した光渦を市販の多光子顕微鏡に導入することで、誘導放出制御 (STED) 法による新規超解像多光子顕微鏡を開発した。

##### 多波長励起高速共焦点顕微鏡

スピニングディスク方式多点走査型スキャナ、白色レーザー光源、音響光学可変フィルタを用い、高速の多波長励起が可能な共焦点顕微鏡を開発した。

(2) PAC および cAMP センサータンパク質を発現させた培養細胞系を樹立した。

### 4. 研究成果

(1) 生体深部における cAMP 濃度変化追跡を目的とし、スピニングディスク方式多点走査型多光子顕微鏡システムを構築した。本シス

テムは、レーザー走査に高速かつ安定に回転する二枚のディスクを用いていることから、通常の高光子顕微鏡が採用する単点走査方式の欠点の一つである、高速画像取得の際の低精細性を克服している。また、本システムの検知光学系は、ダイクロイックミラー、複数のカメラにより蛍光を分光することで、多色イメージング、FRET イメージングが可能な仕様とした。本システムは当初、多光子励起イメージング用の光源として、Ti-Sa レーザーを用いていたが、光強度が十分でなく、高速画像取得と広視野観察を両立することができなかった。そこで、高光強度の新規 Yb レーザーを導入し、励起光学系の最適化を行った。その結果、画像取得におけるミリ秒の高時間分解能はそのままに、取得画像の視野を従来の十倍の拡大することに成功した。本研究成果は、第 23 回 日本バイオイメージング学会 学術集会において、ベストイメージング賞 OLYMPUS 賞を受賞した。また、本成果をまとめた原著論文は Analytical Sciences 誌に受理され、同誌の表紙、注目論文に選定され、Hot Article Award Analytical Sciences を受賞した。さらに、本顕微鏡システムについて、励起用の光路の他に、光刺激用の光路を構築し、Ti-Sa レーザー光による多光子励起光刺激を、多光子励起イメージングと同時に行える仕様とした。現在、本顕微鏡システムを用い、PAC および cAMP センサータンパク質を発現させた培養細胞系について、多光子励起光刺激による単一細胞中の cAMP 濃度制御実験に取り組んでいる。

(2) 将来的には生体深部における単一細胞内小器官レベルでの cAMP 濃度変化の可視化を実現するため、超解像顕微鏡法の一つである誘導放出制御 (STED) 法を適用した超解像多光子顕微鏡を開発した。具体的には、既存の多光子顕微鏡システムに対し、透過型液晶デバイスを介して生成させた光渦ビームを導入し、誘導放出過程を誘起することで、超解像顕微鏡化を達成した。本研究成果をまとめた原著論文は Optics Express 誌に受理された。

(3) 白色レーザー光から、音響光学可変フィルタで単一励起波長成分を自在に抽出することで、高速で多波長励起蛍光像が取得可能な顕微鏡システムの立ち上げを行った。本システムは PAC を始めとする光活性化タンパク質の活性の刺激波長依存性について、簡便に作用スペクトルの測定を行える可能性があり、発現条件の精査等に有用性を発揮することが期待される。本研究成果は、第 23 回 日本バイオイメージング学会 学術集会において、ベストイメージング賞賞間賞を受賞した。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- 1) 村田隆、大友康平、日比輝正、中山博史、根本知己、長谷部光泰、2光子スピニングディスク共焦点顕微鏡による3Dライブイメージング、Plant Morphology、査読有、印刷中  
DOI:なし
  - 2) 大友康平、日比輝正、小澤祐市、根本知己、STED microscopy -super resolution bio-imaging utilising a stimulated emission depletion process、Microscopy、査読有、印刷中  
DOI:未定
  - 3) 大友康平、日比輝正、村田隆、渡邊裕貴、川上良介、中山博史、長谷部光泰、根本知己、Multi-point scanning two-photon excitation microscopy by utilizing a high-peak-power 1042-nm laser、Analytical Sciences、査読有、31巻、2015、307-313  
DOI: 10.2116/analsci.31.307
  - 4) 大友康平、日比輝正、根本知己、STED顕微鏡法-光渦を用いた誘導放出制御による超解像バイオイメージング、0 plus E、査読有、37巻、2015、283-288  
DOI:なし
  - 5) 根本知己、川上良介、日比輝正、飯島光一朗、大友康平、Two-photon excitation fluorescence microscopy and its application in functional connectomics、Microscopy、査読有、64巻、2015、9-15  
DOI: 10.1093/jmicro/dfu110
  - 6) 大友康平、日比輝正、小澤祐市、栗原誠、橋本信幸、横山弘之、佐藤俊一、根本知己、Two-photon excitation STED microscopy by utilizing transmissive liquid crystal devices、Optics Express、査読有、22巻、2014、28215-28221  
DOI: 10.1364/OE.22.028215
  - 7) 根本知己、川上良介、日比輝正、飯島光一朗、大友康平、Deep imaging of living mouse brain utilizing novel laser photonics technologies、Plant Morphology、査読有、24巻、2014、31-35  
DOI:なし
- 〔学会発表〕(計28件(うち招待講演12件))
- 1) 大友康平、新規レーザー走査型蛍光顕微鏡の開発による生物学的可視化領域の拡大、第2回日本プランクトン学会若手の会集会(招待講演)、2015年09月02日~2015年09月02日、北海道大学(北海道札幌市)
  - 2) 村田隆、大友康平、日比輝正、中山博史、根本知己、長谷部光泰、2光子励起スピニングディスク共焦点顕微鏡による植物紡錘体形成の3Dライブイメージング、第67回日本細胞生物学会大会、2015年06月30日~2015年07月02日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
  - 3) 日比輝正、大友康平、伊藤里紗、一本嶋佐理、大嶋佑介、今村健志、根本知己、白色レーザー光を活用した多波長励起高速4次元イメージング、第67回日本細胞生物学会大会、2015年06月30日~2015年07月02日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
  - 4) 大友康平、日比輝正、根本知己、Visualization of biological nano, micro-structures by using novel two-photon excitation laser scanning microscopies、第9回IMCE国際複合医工学会議-CME2015(招待講演)、2015年06月18日~2015年06月21日、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)
  - 5) 大友康平、日比輝正、村田隆、渡邊裕貴、川上良介、中山博史、長谷部光泰、根本知己、3D visualization of living cells and organs by two-photon excitation spinning disk confocal microscopy utilizing a high-peak-power 1042-nm laser、附置研究所間アライアンスによるナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創製戦略プロジェクト平成26年度成果報告会、2015年04月21日~2015年04月21日、九州大学(福岡県福岡市)
  - 6) 村田隆、大友康平、日比輝正、渡邊裕貴、川上良介、中山博史、根本知己、長谷部光泰、多点走査型2光子共焦点顕微鏡による3Dライブイメージング、物質・デバイス領域共同研究拠点第5回活動報告会、2015年04月20日~2015年04月20日、九州大学(福岡県福岡市)
  - 7) 大友康平、蛍光バイオイメージングにおけるレーザー走査型顕微鏡の役割、北海道大学強化のための技術研究会(招待講演)、2015年03月18日~2015年03月18日、北海道大学(北海道札幌市)
  - 8) 根本知己、日比輝正、川上良介、飯島光一朗、大友康平、Improvement of multi-photon microscopy by utilizing new laser technologies、International Symposium on Multi-dimensional fluorescence live imaging of cellular function and molecular activities(招待講演)、2015年01月26日~2015年01月28日、京都国際会館(京都府京都市)

- 9) 大友康平、根本知己、二光子励起蛍光顕微鏡の空間・時間分解能向上、第3回自然科学研究機構コロキウム(招待講演)、2014年12月12日~2014年12月03日、ザ・プリンス箱根(神奈川県足柄下郡)
- 10) 大友康平、日比輝正、小澤祐市、一本嶋佐理、横山弘之、佐藤俊一、根本知己、Improvement of the spatial resolution of two-photon excitation microscopy by utilizing transmissive liquid crystal devices、第37回日本分子生物学会年会(招待講演)、2014年11月25日~2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 11) 大友康平、日比輝正、伊藤里紗、一本嶋佐理、大嶋佑介、今村健志、根本知己、Excitation spectral imaging by utilizing supercontinuum laser light source、ナノマクロ物質・デバイス・システム創製アライアンス 医療材料・デバイス・システムグループ G3 分科会、2014年11月21日~2014年11月22日、九州大学(福岡県福岡市)
- 12) 大友康平、日比輝正、根本知己、Improvement of spatial and temporal resolution in two-photon excitation microscopy、ナノマクロ物質・デバイス・システム創製アライアンス 医療材料・デバイス・システムグループ G3 分科会、2014年11月21日~2014年11月22日、九州大学(福岡県福岡市)
- 13) 大友康平、時間・空間分解能を向上させた多光子顕微鏡法を用いた生体内微細構造の可視化、東北大学 第445回薬学研究科セミナー(招待講演)、2014年11月18日~2014年11月18日、東北大学(宮城県仙台市)
- 14) 大友康平、日比輝正、根本知己、新規レーザー走査型多光子顕微鏡法による生体内微細構造の可視化、IIRS 創立十周年記念学術講演会、2014年11月07日~2014年11月07日、東京大学(東京都文京区)
- 15) 村田隆、大友康平、日比輝正、川上良介、中山博史、野中茂紀、根本知己、長谷部光泰、2光子スピニングディスク顕微鏡による紡錘体形成過程の3Dタイムラプス解析、植物形態学会第26回総会・大会、2014年09月11日~2014年09月11日、明治大学(神奈川県神奈川市)
- 16) 大友康平、日比輝正、根本知己、Improvement of spatial and temporal resolutions of two-photon excitation microscopy for biological specimens、HOKUDAI-NCTU Joint Symposium on Nano, Photo and Bio Sciences(招待講演)、2014年09月10日~2014年09月11日、北海道大学(北海道札幌市)
- 17) 伊藤里紗、日比輝正、大友康平、一本嶋佐理、大嶋佑介、今村健志、根本知己、スーパーコンティニューム光を用いた多色励起高速共焦点顕微鏡法、2014年度バイオイメージング学会、2014年09月04日~2014年09月06日、大阪大学(大阪府吹田市)
- 18) 渡邊裕貴、大友康平、日比輝正、村田隆、川上良介、中山博史、根本知己、励起レーザー光学系の最適化による多点走査型二光子顕微鏡法の改良、2014年度バイオイメージング学会、2014年09月04日~2014年09月06日、大阪大学(大阪府吹田市)
- 19) 大友康平、日比輝正、根本知己、Improvement of Spatial and Temporal Resolutions of Multi-Photon Excitation Microscopy for Live Specimens、The 37th Naito Conference、2014年07月15日~2014年07月18日、ヒルトンニセコビレッジ(北海道ニセコ町)
- 20) 大友康平、日比輝正、小澤祐市、横山弘之、佐藤俊一、根本知己、透過型液晶デバイスを用いて作成した光滑による多光子励起 STED 顕微鏡法、附置研究所間アライアンスによるナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創製戦略プロジェクト平成25年度成果報告会、2014年05月30日~2014年05月30日、大阪大学(大阪府豊中市)
- 21) 大友康平、新規レーザー走査型顕微鏡を用いた生体内微細構造の可視化、日本顕微鏡学会第70回記念学術講演会(招待講演)、2014年05月11日~2014年05月13日、幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)
- 22) 大友康平、多光子顕微鏡の時間・空間分解能向上、理研シンポジウム:最先端光計測とライフサイエンスの近未来-バイオ・ラマン2017-(招待講演)、2014年05月01日~2014年05月02日、東北大学(宮城県仙台市)
- 23) 大友康平、日比輝正、小澤祐市、横山弘之、佐藤俊一、根本知己、Development of the stimulated emission depletion microscope using transmission type liquid crystal devices、Focus On Microscopy 2014、2014年04月13日~

2014年04月16日、The University of Sydney (Sydney, Australia)

- 24) 中山博史、大友康平、村田隆、日比輝正、川上良介、根本知己、Multiphoton Multipoint Microscope、Focus On Microscopy 2014、2014年04月13日～2014年04月16日、The University of Sydney (Sydney, Australia)
- 25) 根本知己、日比輝正、川上良介、大友康平、新規レーザーや光技術を用いた多光子顕微鏡の高性能化、8th NIBB バイオイメージングフォーラム (招待講演)、2014年03月04日～2014年03月04日、岡崎カンファレンスセンター (愛知県岡崎市)
- 26) 大友康平、日比輝正、小澤祐市、横山弘之、佐藤俊一、根本知己、透過型液晶デバイスを用いた二光子 STED 顕微鏡の開発、第4回 Vivid Workshop、2014年02月20日～2014年02月22日、瑠璃光 (石川県加賀市)
- 27) 大友康平、日比輝正、小澤祐市、横山弘之、佐藤俊一、根本知己、Development of the stimulated emission depletion microscope by use of transmission type liquid crystal devices、The 14th RIES-Hokudai International Symposium、2013年12月11日～2013年12月12日、シャトレゼガトーキングダムサッポロ (北海道札幌市)
- 28) 根本知己、日比輝正、川上良介、大友康平、2光子顕微鏡を用いた生体脳深部観察法 -植物組織・細胞への応用可能性、日本植物学会 第77回大会 (招待講演)、2013年09月13日～2013年09月15日、北海道大学 (北海道札幌市)

〔図書〕(計1件)

- 1) 大友康平、日比輝正、小澤祐市、一本嶋佐理、佐藤俊一、根本知己、Taylor & Francis Books, Inc. SUPER-RESOLUTION IMAGING IN MEDICINE AND BIOLOGY、2015、印刷中

## 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・特任助教  
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

伊関 峰生 (ISEKI, Mineo)  
東邦大学・薬学部・准教授  
研究者番号：60414009

渡邊 正勝 (WATANABE, Masakatsu)  
光産業創成大学院大学・特任教授  
研究者番号：40144226