

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26711010

研究課題名(和文) 幹細胞化過程の高分解能ライブイメージングを可能にする新規補償光学顕微鏡法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel adaptive optics microscopy enabling high-resolution live imaging during stem-cell formation

研究代表者

玉田 洋介 (TAMADA, Yosuke)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・助教

研究者番号：50579290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)： 生きた細胞や組織の深部を観察すればするほど、生体構造により光が乱れ、像が劣化する。そこで、光の乱れを補正して高解像観察を行う補償光学を応用し、精細なライブイメージングを行うことが本研究の目的である。本研究では、生きた植物細胞による光の乱れを点像分布解析と計算によって解明した。この情報は高精度の補償光学系の設計に不可欠である。また、補償光学に最も重要な波面計測に関して、感度を約25倍向上させるとともに、画像相関法を補償光学系に適用し、精細なライブイメージングを行うことに成功した。これにより、細胞内の広範囲で補償光学系を動作させ、さらに励起光によるダメージも大幅に低減させることが可能となった。

研究成果の概要(英文)： Images inside living cells and tissues always degrade because the light used for the imaging is disturbed by biological structures. This project aims at applying adaptive optics (AO) to microscopy to correct the disturbance of light and performing high-resolution deep live imaging during stem-cell formation of the moss *Physcomitrella patens*. We revealed the disturbance of light that goes through living plant cells by point spread function analysis, mathematical calculation, and simulation. This is essential to establish high-accuracy AO system. In addition, we increased the sensitivity of wavefront sensing around 25 folds, and also obtained the wavefront information by image correlation. These allowed us to perform wavefront sensing and drive AO in most place in living cells and to reduce damages caused by excitation light. Applying above achievements to our AO microscope, we successfully perform fine live imaging inside living plant cells.

研究分野：光学、イメージング科学、生物物理学、細胞生物学

キーワード：補償光学 ライブイメージング 顕微鏡 画像相関 幹細胞 植物 光学特性

1. 研究開始当初の背景

申請者は、コケ植物ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) の幹細胞化過程におけるクロマチン修飾の動態と機能を明らかにするため、クロマチン修飾検出プローブを開発し、幹細胞化過程の単一細胞核ライブイメージングを行ってきた。細胞核は直径約 7~14 μm と小さいため、クロマチン修飾の動態を解析するためには、光学顕微鏡の回折限界 (約 200 nm) に近い分解能で観察を行う必要がある。しかしながら、期待した分解能が得られたのは核が細胞内で対物レンズ側に移動した短い時間だけであり、対物レンズから見て細胞の深部に核が移動した場合、特に像が劣化した。こうした像の劣化は、細胞内構造体由来する光の屈折、回折、散乱など、「光の乱れ」が原因であると考えられた。実際に、位相差顕微鏡を用いた解析によって、生きた植物細胞では葉緑体が主に光を乱す原因であることを解明した (Tamada et al. 2014, *Int J Optomechatroni*)。

こうした光の乱れをハードウェアレベルで補正して、高解像度観察を可能にする技術として、「補償光学 (adaptive optics, AO)」が知られている。補償光学は、地上望遠鏡を用いて天体観測を行う際に、大気の影響による光の乱れを補正して高解像度の天体像を得る技術であり、国立天文台すばる望遠鏡では回折限界にせまる解像度が得られている (図1)。

具体的な補償光学の動作を以下に示す。(1) 波面センサーを用いて、観察対象の近傍に存在する比較的明るい参照光源 (ガイド星) からの光の乱れを計測する。(2) 光の乱れの情

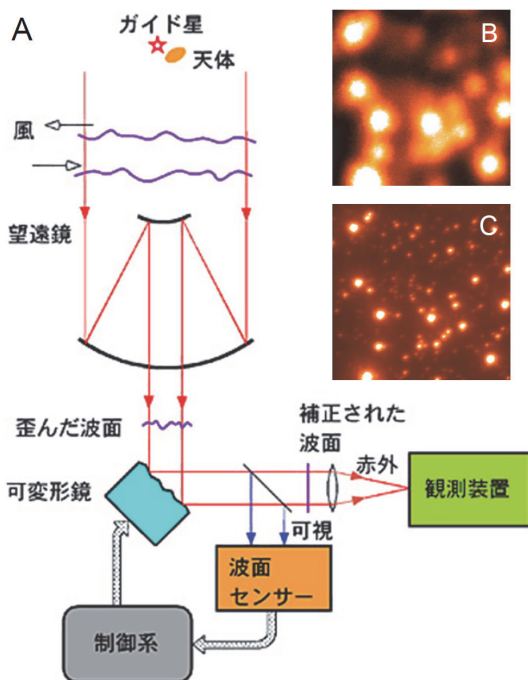


図1 補償光学とその効果 (A) 補償光学系の模式図。(B, C) 銀河中心像。補正なし (B) と補償光学あり (C) をそれぞれ示す。国立天文台提供。

報から制御コンピューターが補正量を計算し、可変形鏡をフィードバック制御する。(3) 可変形鏡によって補正された光の乱れの残差は波面センサーによって計測され、それに応じてさらに可変形鏡が制御される。(4) この「クローズドループ制御」を、光の乱れの変化速度よりも早く繰り返すことによって、参照光源周辺について光の乱れが補正された鮮明な像が得られる。

補償光学をライブイメージングに適用することで、生きた細胞や組織の深部でも高解像度観察が行えるようになる考えた。

2. 研究の目的

以上を受け、本研究では、光の乱れを補正して高解像度観察を行う天文技術である補償光学を応用した新規顕微鏡系を確立し、幹細胞化過程の精細なライブイメージングを行うことを目的とした。

3. 研究の方法

以下の実験を、光学研究者の服部 雅之博士、光工学研究者の三浦 則明博士、天文学研究者の早野 裕博士ら、研究協力者との密接な共同研究のもと進めた。

補償光学系の構築

補償光学系の概要を図2に示す。光学定盤上に顕微鏡土台 (オリンパス IX83) もしくは直接対物レンズを固定して、試料を観察した。試料から見て対物レンズの後ろ側に、ダイクロックミラーを置き、反射側に励起光源として青色 LED を置いた。透過側に二枚のリレーレンズを配置し、その後ろに可変形鏡 (144 素子、アルミコーティング、BOSTON MEMS) を置いて補正面とした。さらにその後ろに一枚目のビームスプリッターを配置し、反射側に葉緑体や蛍光タンパク質などをスポット励起するための緑色レーザー (532 nm) を配置した。励起して得られた蛍光スポットは参照光源として用いた。一枚目のビームスプリッターの直進側には二枚目のビームスプリッターを配置し、その反射側に結像レンズと検出器 (サイエンスカメラ) を配置した。直

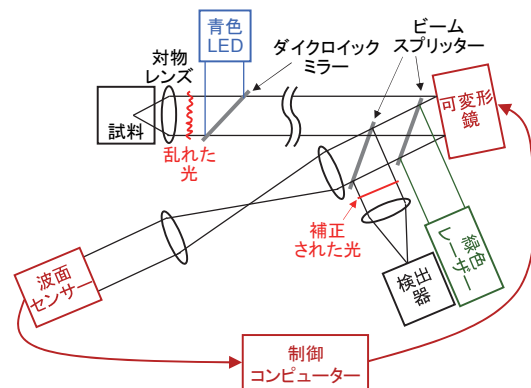


図2 補償光学顕微鏡の模式図 補償光学系によるフィードバック制御を下部の茶矢印で示した。

進側には、二枚のリレーレンズを配置し、その後ろにシャックハルトマン波面センサー (BOSTON MEMS) を配置した。

補償光学系の動作

蛍光ビーズなど点光源の場合は青色 LED、葉緑体や蛍光タンパク質のように広がった光源の場合は緑色レーザーを用いて蛍光体を励起し、得られた点に近い光源からの光を用いて光の乱れを計測し、その情報をもとに可変形鏡をフィードバック制御して補償光学を動作させた。

試料の準備

培養後 4~6 週目のヒメツリガネゴケ茎葉体から葉を切断し、液体 BCDAT 培地 (Nishiyama et al. 2000, DNA Res) とともにスライドガラス上に静置した。その上に、50 μm のシリコンシートをスペーサーとしてカバーガラスを置いた。

また、植物細胞を模した人工試料として、カバーガラスにエッチング剤 (Armour Etch Glass Etching Cream, Armour Products) を処理して揺らぎ層とし、観察対象としてグリッド線が引かれたスライドガラス (Grid distortion target R1L3S3P, Thorlabs) に polyethyleneimine を用いて蛍光ビーズを付着させ、シリコンオイル (信越シリコン、KF-50-1000cs, $n = 1.427$) を用いて封入した。その際、実際の生きた植物細胞による光の乱れと同程度に光を乱すように、エッチング剤の処理時間やシリコンオイルの屈折率を調整した。蛍光ビーズは参照光源と蛍光像の観察のために用い、グリッド像は明視野像の観察と補正範囲の検証に用いた。

画像相関法による波面計測

シャックハルトマン波面センサーにおいて、レンズレットアレイによって結像した像 (図 3) に関してそれぞれ相関を取り、変位を求めることで、波面を推定した。

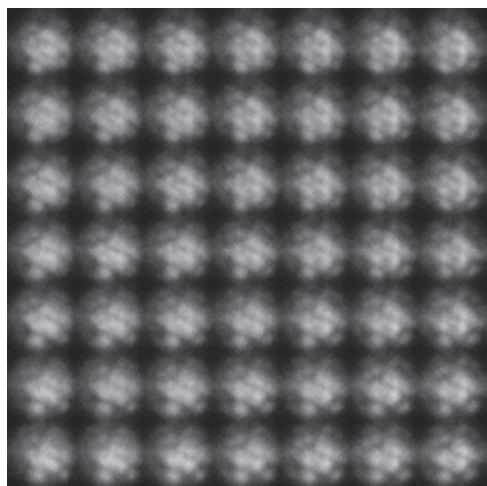


図3 シャックハルトマン波面センサーによるヒメツリガネゴケ葉細胞の葉緑体蛍光像

4. 研究成果

生きた植物細胞において、光を屈折させて顕微鏡像を劣化させる構造体が葉緑体であることを明らかにしていたが、本研究では葉緑体によって実際に光がどのように乱れるのかについて点像分布解析 (図 4) を行った。さらに、それらに対して数値計算、シミュレーションによって解明を行った。具体的には、葉緑体の位相差観察の結果をもとに、葉緑体による光の乱れを計算し、その結果をシミュレーションすることで、植物細胞による点像分布 (図 4 C) を再現した。この結果は、より高精度の補償光学系の設計に必須であるだけでなく、生きた細胞と光との相互作用を理解するために必要不可欠である。

補償光学を動作させるためには、光の乱れを正確に計測することが必要不可欠である。シャックハルトマン波面センサーに代表される波面センサーの多くは光を分割する必要があるため、波面センサーを用いて光の乱れを正確に計測するには参照光源として明るい点光源が必要不可欠である。しかしながら、生きた細胞や組織において明るい点光源を得ることは容易ではない。研究開始前までは、比較的明るい葉緑体の自家蛍光を参照光源として用いていた。本研究では、レンズやミラーの配置など光学系を工夫して波面センサー上の集光率を上げることで、自家蛍光よりもはるかに弱い蛍光タンパク質の蛍光スポットを参照光源として補償光学を動作させ、精細なライブイメージングを行うことに成功した。蛍光ビーズを用いた実験から、感度が約 25 倍向上していることを確認した。

さらに、画像の相関によって光の乱れを計測する画像相関法を補償光学系に適用した。その結果、生きた植物細胞の蛍光像 (図 5) に加えて、明視野像を用いて画像相関法による波面計測を行い、補償光学を動作させて精細な画像を得ることに成功した。これによって、点光源が得られないような試料に対しても補償光学を動作させることができるようになった。また、励起光による生細胞や蛍光タンパク質へのダメージを大幅に低減した波面計測と補正が可能となった。



図4 生きた植物細胞の点像分布解析

一層の細胞層からなるヒメツリガネゴケ葉に 390 nm の蛍光ビーズを貼りつけ、蛍光顕微鏡にて観察した。(A) 葉の対物レンズ側に貼りつけた蛍光ビーズ像。(B, C) 対物レンズから見て反対側に貼りつけた蛍光ビーズ像。(B) と (C) は同じ像だが、(B) はコントラストを (A) に合わせたもの。シグナル強度のカラーコードを下部に示す。バー: 2 μm 。

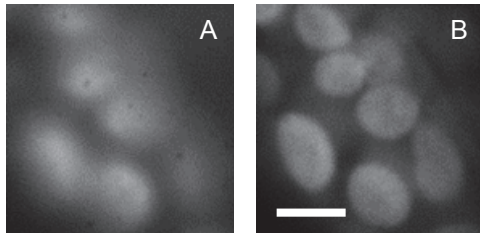


図5 画像相関法による補償光学
画像相関法による葉緑体自家蛍光のデフォーカス像の補正。補正前 (A) と補償光学動作後 (B) をそれぞれ示す。バー: 5 μm 。

以上の成果のうち、未発表のものについては現在論文を執筆中である。

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 10 件)

- ① Masayuki Hattori, Yosuke Tamada, Takashi Murata, Shin Oya, Mitsuyasu Hasebe, Yutaka Hayano, Yasuhiro Kamei. Artificial testing targets with controllable blur for adaptive optics microscopes. *Optical Engineering*, 56: 080502 (2017) 査読有
doi: 10.1117/1.OE.56.8.080502.
- ② 玉田 洋介, 早野 裕, 亀井 保博, 服部 雅之, 「生組織深部の超解像イメージングへ: 光の乱れをアクティブに補正する補償光学」、*顕微鏡* 52: 72-76 (2017) 査読有
<http://microscopy.or.jp/kenbikyoo/>
- ③ 玉田 洋介, 「新規補償光学系の開発とその生物顕微鏡への応用」、*光学* 46: 236 (2017) 査読有
<http://myosj.or.jp/publication/kogaku/>
- ④ 玉田 洋介, 村田 隆, 服部 雅之, 「補償光学による深部イメージング」、*生体の科学* 68: 410-411 (2017) 査読無
<http://medicalfinder.jp/toc/2425/current>
- ⑤ Masayuki Hattori, Yosuke Tamada. The development of an adaptive optics system and its application to biological microscope. *Proceedings of SPIE*, 10021, 1002106 (2016) 査読有
doi: 10.1117/12.2246440.
- ⑥ 秋山 毅志, 早野 裕, 服部 雅之, 玉田 洋介, 「波面センサーによる密度揺動計測」、*プラズマ・核融合学会誌* 92: 912-916 (2016) 査読有
<http://www.jspf.or.jp/journal/>
- ⑦ Yosuke Tamada, Masayuki Hattori. Adaptive optics microscopy for fine imaging of live

plant cells. *SPIE Newsroom*, 9 March, 1-3 (2016) 査読無
doi: 10.1117/2.1201602.006335.

- ⑧ 玉田 洋介, 早野 裕, 服部 雅之, 「天文学の補償光学で生物の深部を観察」、*日経バイオテク*, 2016.6.27: 37-9 (2016) 査読無
<https://bio.nikkeibp.co.jp/>
 - ⑨ 玉田 洋介, 「葉緑体レーザーガイド星を用いた補償光学ライブイメージング」、*光学* 44: 384-90 (2015) 査読有
<http://myosj.or.jp/publication/kogaku/>
 - ⑩ 玉田 洋介, 服部 雅之, 「補償光学顕微鏡を用いたライブイメージング」、*光アライアンス* 26: 1-7 (2015) 査読無
http://www.nikko-pb.co.jp/products/list.php?category_id=13
- [学会発表] (計 18 件)
- ① 玉田 洋介, 「生きた植物細胞を通過した光の乱れの解明とその制御による深部生細胞イメージング」、*日本光学会フォトダイナミズム研究グループシンポジウム*, 三鷹, 2018年2月6日
 - ② 玉田 洋介, 服部 雅之, 「生細胞を通過した光の乱れとそのアクティブ補正による深部イメージング」、*第43回レーザー顕微鏡研究会*, 大阪, 2018年1月19日 (招待講演)
 - ③ 菊池 駿, 本間 佑涼, 三浦 則明, 玉田 洋介, 服部 雅之, 「顕微鏡補償光学用波面センシングのための画像前処理」、*第14回日本光学会北海道支部学術講演会*, 札幌, 2018年1月6日
 - ④ Yosuke Tamada, Masayuki Hattori. Investigation and correction of optical disturbance caused by living plant cells. *OSJ - OSA Joint Symposia 2017*, Tokyo, Japan, Oct. 31st, 2017 (invited)
 - ⑤ Yosuke Tamada. Adaptive optics: Towards deep imaging of living cells by active correction of optical disturbance. *The 55th annual meeting of The Biophysical Society of Japan*, Kumamoto, Japan, Sep. 20th, 2017 (invited)
 - ⑥ Yusuke Honma, Noriaki Miura, Yosuke Tamada, Masayuki Hattori. Development of correlation-based adaptive optics for microscopic observation. *The 24th Congress of the International Commission for Optics*, Tokyo, Japan, Aug. 25th, 2017
 - ⑦ 玉田 洋介, 服部 雅之, 「補償光学: 光の乱れを補正して生物の深部を観察」、*第33回日本DDS学会学術集会*, 京都, 2017年7月6日 (招待講演)
 - ⑧ Yosuke Tamada. Adaptive optical imaging through complex living plant cells. *Biomedical Imaging and Sensing*

- Conference 2017*, Yokohama, Japan, Apr. 20th, 2017 (program committee member and symposium organizer)
- ⑨ 玉田 洋介、服部 雅之、「天体観測に用いる補償光学を応用した新規生細胞イメージング法の確立」、**第11回NIBB バイオイメージングフォーラム**、岡崎、2017年2月14日
- ⑩ 玉田 洋介、服部 雅之、「天文学の補償光学を応用した生細胞深部の高解像イメージング」、**第8回光塾**、横浜、2016年12月17日(招待講演)
- ⑪ 秋山 毅志、稲垣 滋、玉田 洋介、服部 雅之、村田 隆、亀井 保博、野中 茂紀、大屋 真、早野 裕、「シャック・ハルトマンセンサーの拡張による分子生物学的揺らぎとプラズマ揺動の計測」、**日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2016**、東京、2016年10月31日～11月2日
- ⑫ Yosuke Tamada, Masayuki Hattori. Adaptive optics microscopy for high resolution imaging of the stem-cell formation in plants. *International Symposium on Optical Memory 2016*, Kyoto, Japan, Oct. 17th, 2016 (invited)
- ⑬ Masayuki Hattori, Yosuke Tamada. The development of an adaptive optics system and its application to biological microscope. *SPIE conference: Optical Design and Testing VII*, Beijing, China, Oct. 12th, 2016 (invited)
- ⑭ Yosuke Tamada, Masayuki Hattori. Adaptive optics microscopy: Towards high resolution imaging of the fertilization in living plants. *JSAP-OSA Joint Symposia 2016*, Niigata, Japan, Sep. 13th, 2016 (invited)
- ⑮ 玉田 洋介、「補償光学顕微鏡による生きた細胞の高解像観察」、**平成28年度フォトニクス技術フォーラム 第1回光情報技術研究会**、大阪、2016年7月8日(招待講演)
- ⑯ 玉田 洋介、「すばる望遠鏡から顕微鏡へ：細胞の運命転換過程の精細な in vivo イメージングを可能にする補償光学顕微鏡」、**第339回 細胞工学研究会講演会**、島根、2016年2月9日(招待講演)
- ⑰ Yosuke Tamada, Masayuki Hattori. Establishment of adaptive optics microscopy for fine live imaging during the stem-cell formation in plants. *Workshop on microscopy, biology, medicine, and advanced CMOS imagers*, Hamamatsu, Japan, Nov. 20th, 2015 (invited)
- ⑱ 玉田 洋介、服部 雅之、早野 裕、村田 隆、大屋 真、野中 茂紀、亀井 保博、長谷部 光泰、「植物内部で起きる受精の可視化への挑戦：補償光学顕微鏡による高解像観察」、**日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2015**、東京、2015年10月29日(シンポジウムオーガナイザー)

〔図書〕(計1件)

- ① 玉田 洋介、早野 裕、服部 雅之、「超解像深部ライブイメージングを可能にする補償光学」、初めてでもできる！超解像イメージング、岡田 康志(編)、羊土社、263-70(2016)

〔その他〕

ホームページ

基礎生物学研究所 ウェブサイト(生物進化研究部門)

http://www.nibb.ac.jp/sections/evolutionary_biology_and_biodiversity/hasebe/

基礎生物学研究所 生物進化研究部門
研究室ウェブサイト

<http://www.nibb.ac.jp/evodevo/>

日本光学会 研究グループ ウェブサイト

<http://mysj.or.jp/group/>

アウトリーチ活動等

- ① 公開研究会オーガナイザー：高見 英樹、山本 裕紹、三浦 則明、池田 思朗、西村 智、渡邊 恵理子、早野 裕、服部 雅之、玉田 洋介、「フレキシブルイメージング：光源から揺らぐ媒質、光学系、データ解析までの統合と柔軟な制御への挑戦」、日本光学会フォトダイナミズム研究グループシンポジウム、三鷹、2018年2月5～6日
- ② 高校生研究ポスター発表 選任審査員：玉田 洋介ら、日本植物学会第81回大会、野田、2017年9月10日
- ③ 公開研究会オーガナイザー：亀井 保博、高見 英樹、早野 裕、武田 光夫、山本 裕紹、服部 雅之、村田 隆、野中 茂紀、玉田 洋介、「光学と生物学の融合によって切り拓く新しいバイオイメージング」、第11回NIBB バイオイメージングフォーラム、岡崎、2017年2月14～15日
- ④ 一般公開：玉田 洋介ら、「生き物の不思議」、基礎生物学研究所一般公開、岡崎、2016年10月8日
- ⑤ Organizer of the public international symposium: Hideki Takami, Yutaka Hayano, Mitsuo Takeda, Hirotsugu Yamamoto, Noriaki Miura, Masayuki Hattori, Yosuke Tamada. "Super adaptive optics with wave field correction: Toward perfect imaging of the universe and live organisms", Symposium series "From Subaru telescope to microscope" 3, Mitaka, Japan, Mar. 23rd, 2016
- ⑥ 公開研究会オーガナイザー：亀井 保博、高見 英樹、早野 裕、武田 光夫、山本 裕紹、服部 雅之、村田 隆、野中 茂紀、玉田 洋介、「新時代のバイオイメージングの開拓」、第10回NIBB バイオイメージングフォーラム、岡崎、2016年2月16～17日
- ⑦ 公開講座：玉田 洋介、「細胞のなかの揺らぎを通して見る生命の仕組み」、岩手大学

公開講演会「光で銀河の誕生から万能細胞まで解き明かそう」、盛岡、2015年2月14日

- ⑧ 公開研究会オーガナイザー：高見 英樹、平岡 泰、岡田 康志、三浦 則明、秋山 正幸、宇治 彰人、早野 裕、大屋 真、亀井 保博、服部 雅之、玉田 洋介、「次世代三次元補償光学系を用いた生体イメージング・光操作に向けて」、シンポジウムシリーズ すばる望遠鏡から顕微鏡へ2、三鷹、2014年8月20～21日
- ⑨ 高校生 研究・施設紹介：玉田 洋介ら、愛知県立豊田西高等学校の高校生約30名に研究・施設紹介、岡崎、2014年8月7日

6. 研究組織

(1)研究代表者

玉田 洋介 (TAMADA, Yosuke)
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・助教
研究者番号： 50579290

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

服部 雅之 (HATTORI, Masayuki)
国立天文台・TMT推進室・特任助教
研究者番号： 20308208

早野 裕 (HAYANO, Yutaka)
国立天文台・先端技術センター・准教授
研究者番号： 80390623

大屋 真 (OYA, Shin)
国立天文台・TMT推進室・特任准教授
研究者番号： 80399287

三浦 則明 (MIURA, Noriaki)
北見工業大学・工学部・教授
研究者番号： 30209720

亀井 保博 (KAMEI, Yasuhiro)
基礎生物学研究所・生物機能解析センター・特任准教授
研究者番号： 70372563

村田 隆 (MURATA, Takashi)
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・准教授
研究者番号： 00242024