

機関番号：63904

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770177

研究課題名 (和文) 分光・ラマンイメージングが可能なライトシート型顕微鏡 λ -DSLM の開発

研究課題名 (英文) Lambda-DSLM, a new light-sheet microscope for spectroscopy

研究代表者

野中 茂紀 (NONAKA SHIGENORI)

基礎生物学研究所・時空間制御研究室・准教授

研究者番号：90435529

研究成果の概要 (和文) : 深部観察性能と低光毒性を特徴とする光シート型顕微鏡 DSLM (Digital Scanned Light-sheet Microscope) に分光機能を追加した新しい顕微鏡システム (λ -DSLM) を作製した。蛍光ビーズや輝線光源を用いたシステム評価を行い、蛍光アンミキシング解析やラマンイメージングが十分可能な波長分解能であることを確認した。実際の蛍光蛋白質を発現する生体試料を用いた評価実験、およびシステム制御と画像構築・解析まで一括して行うためのプログラムの開発は進行中である。

研究成果の概要 (英文) : Light-sheet microscopy including Digital Scanned Light-sheet Microscope (DSLM) has advantages with its deep penetration and low photo-toxicity. We have developed a new microscope system combining spectroscopy with DSLM, namely lambda-DSLM. So far we have confirmed that the system has enough spectral resolution for linear unmixing or fluorescence or raman imaging, via analyses using fluorescent beads or emission lines from light sources. Imaging of biological specimen expressing fluorescent proteins and development of an integrated software for device control and image reconstruction are ongoing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：発生生物学, 応用光学

科研費の分科・細目：0189 ライフサイエンス(共通基礎研究)

キーワード：発生・分化, 細胞・組織, 共焦点顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は、欧州分子生物学研究所 (EMBL) の Ernst Stelzer 博士らが開発した光シート型顕微鏡 DSLM について、所属機関である基礎生物学研究所への導入、その発生生物学への応用、さらに多様な生物試料を扱う研究者との共同研究を進めてきた。この顕微鏡は、試料の側面から励起光をシート

状に照射することで、文字通りの光学切片像を得るものである。正確には、ガルバノミラーを使い励起光の細いビームを走査することで擬似的に光シートを作っている。そして電動ステージによって試料を奥行き方向に移動させつつ撮影することで立体像を得る。(2) DSLM は、生物試料の立体観察の代表的な方法論である共焦点顕微鏡、2光子顕微鏡

に比べ、共焦点顕微鏡よりも光毒性による試料へのダメージが小さく、2光子顕微鏡に匹敵する深部観察能を持ち、かつより高速であるという利点を持つ。一方で、重なりあう複数種の蛍光分子からのシグナルを分離するための方法論として最近の共焦点顕微鏡に搭載されている **linear unmixing** などの分光機能は実現されておらず、多種類の蛍光色素による観察や植物細胞のように自家蛍光の多い試料の観察は制約を受けている。分光機能を備えた DSLM、名付けて λ -DSLM は生物学の発展に大きく寄与する、したがって自ら開発すべきであるという着想に至り研究代表者は開発を開始した。

2. 研究の目的

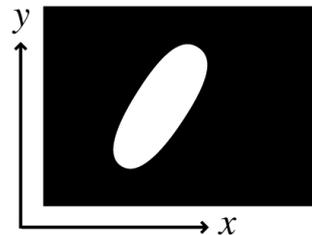
(1) 前述の問題意識に基づき、生物組織・個体レベルでのライブイメージングの可能性を広げるため、前述した DSLM の利点を生かしながら、**FRET** イメージングや自家蛍光の除去を可能にする分光機能を付け加えた顕微鏡を開発することにした。

(2) 一方、この方法論は、原理的にはラマン分光イメージングにも応用可能である。ラマン分光とは、分子の振動エネルギーとのやりとりによって散乱光の波長がわずかに変わる現象を利用したものであり、蛍光染色法では観察しにくい脂質のような分子を無染色で見ることができる(例えば Scalfi-Happa et al, *Medical Laser Application* 2007)。波長変化の小ささやシグナルの弱さといった特有の問題はあるものの、それを検出するための顕微鏡自体は蛍光顕微鏡と互換性があり、蛍光観察用に作った λ -DSLM を小改造することによってラマンイメージングも可能ではないかと考えた。これまでラマンイメージングはどちらかといえばそれ自体が研究対象であり、観察対象も培養細胞など扱いやすいものが中心だが、DSLM と組み合わせることにより組織・個体レベルでのラマンイメージングが可能になれば今まで見ることでできなかった新しい現象の発見が期待できる。そこで、ラマンイメージングも目標のひとつとして視野に入れた開発を行うことにした。

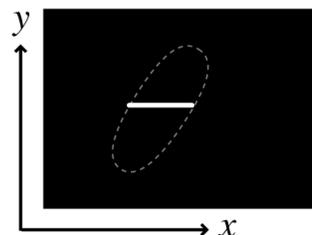
3. 研究の方法

(1) DSLM において励起光のシートは真の光シートではなく、細いビームをガルバノミラーによって走査することで擬似的に作ったものである。つまり、もし走査しなければ得られる画像情報は面ではなく線上だけになる。それをこの線と垂直な方向に分光することで、別の言い方をすれば CCD 素子の y 方向を空間情報ではなく波長情報に割り当て

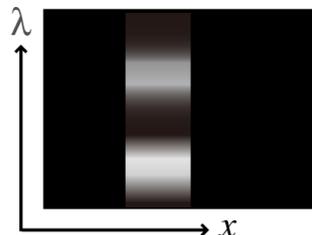
ることで、分光機能を実現することができる。2次元・3次元の画像は、電動ステージによって試料を動かしながら撮影することによって取得する。一方で、CCD の1フレームで XY 画像を捉えるわけではないため、DSLM の高速性はある程度犠牲になる。そこでなるべく露光時間を短縮できるよう、高感度で蛍光を検出することを旨としてシステムを構築した。



通常の DSLM
y 方向にビームを走査する



ビームを走査しなければ
線だけが見える



分光 DSLM
CCD の y 方向を分光に使う

(2) 具体的には、試料ステージには、4 軸方向 (XYZ θ) に走査するためのモータデバイスを搭載し、従来の DSLM と同様に様々な方向からの観察を可能にした。観察側の光学系は、対物レンズ・ロングパスフィルター・結像レンズで構成され、結像面に分光スリットが配置されている。本装置の要である分光器には、透過型 VPHG (Volume Phase Holographic Grating) を用いることで低迷光かつ高波長分解能を実現した。スリットを通過した光は、スリット開閉方向 (平行方向) に分光され、対する垂直方向は位置情報を保ったまま、分光器出口の CCD 受光面に投影される。試料ステージを走査して任意の視野で一連の画像データを得たのち、分光イメージを再構築する仕組みである。画像取得には、超高感度 EM (Electron Multiplying) -CCD 検出器を用い

ることにより、微弱な蛍光シグナルやさらに数桁シグナル強度が弱いラマン散乱光による分光・イメージング解析を想定した顕微鏡システムの土台を完成させた。

4. 研究成果

(1) 現在までのところ、本システムを用いて蛍光ビーズや輝線光源を用いたシステム評価を行い、蛍光アンミキシング解析やラマンイメージングが十分可能な波長分解能であることが確認できた。

(2) 蛍光蛋白質を発現する生体試料を用いた評価実験およびシステム制御と画像構築・解析まで一括して行うためのプログラムの開発は進行中である。今後は、多様な試料形態で多色同時蛍光イメージングへの実用化を目指して、チャンバーや試料保持方法、レーザー照射方法などの工夫を行っていく予定である。

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)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 野中茂紀「光シート型顕微鏡によるマウス胚丸ごとイメージング」第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会シンポジウム, 2011. 3. 28-30, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市, 震災の影響により誌上開催)
- ② Shigenori Nonaka “Live Imaging Of The Whole Mouse Embryo During Gastrulation” 20th Anniversary Joint-Symposium of School of Science, University of Hyogo 兵庫県立大学理学部 20 周年記念 国際シンポジウム, 2011. 2. 26-27, 兵庫県立先端科学技術支援センター (兵庫県たつの市)
- ③ 野中茂紀, 「光シート型顕微鏡 DSLM によるマウス胚の丸ごとイメージング」バイオイメージ・インフォマティクス ワークショップ 2011, 2011. 1. 28-29, 理化学研究所 (神奈川県横浜市)
- ④ T. Ichikawa, P. J. Keller, K. Nakazato, E. H. Stelzer, H. Kobayashi, A. Mochizuki, S. Nonaka “Live Imaging of Whole Mouse Embryo during Gastrulation.” The ASCB 50th Annual Meeting, 2010. 12. 11-15, Philadelphia Convention Center (米国フィラデルフィア)
- ⑤ 野中茂紀, 高尾大輔, 市川壮彦「光シート型顕微鏡の今後の課題」定量生物学会 第三回年会, 2010. 11. 26-28, 東京大学生産技術研究所 (東京都目黒区)
- ⑥ 野中茂紀「光シート型顕微鏡 DSLM によるマウス胚の丸ごとイメージング」第一回絨毛研究会, 2010. 11. 13, 基礎生物学研究所 (愛知県岡崎市)
- ⑦ 野中茂紀「2 光子顕微鏡と光シート型顕微鏡による生物試料の深部観察と課題」基生研/天文台補償光学ワークショップ, 2010. 10. 27, 国立天文台 (東京都三鷹市)
- ⑧ 野中茂紀「光シート型顕微鏡 DSLM・原理と特徴・胚の丸ごとイメージング」第 11 回運動器科学研究会, 2010. 9. 10-11, 軽井沢万平ホテル (長野県軽井沢市)
- ⑨ 野中茂紀「ライトシート型顕微鏡 DSLM によるマウス胚の丸ごとイメージング」第 19 回バイオイメージング学会シンポジウム, 2010. 9. 9, 慶応大学 (神奈川県横浜市)
- ⑩ Takehiko Ichikawa, Philipp Keller, Ernst Stelzer, Shigenori Nonaka “Live imaging of the whole mouse embryo during gastrulation (原腸陥入期におけるマウス全胚のライブイメージング)” 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network, Kyoto, 2010. 6. 20-23, 京都国際会館 (京都市)
- ⑪ T. Ichikawa, P. J. Keller, E. H. K. Stelzer, S. Nonaka “Live imaging of the whole mouse embryo” Focus on Microscopy 2010, 2010. 3. 28-31, Shanghai Everbright Convention and Exhibition Center (中国上海市)
- ⑫ 野中茂紀「線毛による哺乳類胚の左右初期決定」第 115 回日本解剖学会シンポジウム, 2010. 3. 29, 岩手県民会館 (岩手県盛岡市)
- ⑬ 市川壮彦, Philipp Keller, Ernst Stelzer, 野中茂紀「光シート型顕微鏡によるマウス原腸陥入胚の丸ごとライブイメージング」第 32 回日本分子生物学会年会ワークショップ, 2009. 12. 12, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑭ 野中茂紀「マウス発生における左右非対称の起源と光シート顕微鏡によるイメー

ジング」 奈良先端科学技術大学院大学シンポジウム「視る生物学4 -進化するイメージング-」, 2009. 11. 24, 奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県生駒市)

- ⑮ Shigenori Nonaka “Symmetry breaking in developmental biology: the left-right determination” 名古屋大学 G-COE リトリート, 2009. 9. 28, 三重県鈴鹿市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 茂紀 (NONAKA SHIGENORI)

基礎生物学研究所・時空間制御研究室・准教授

研究者番号 : 90435529