

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282128

研究課題名(和文) 補償光学を応用した局所遺伝子発現顕微鏡の高度化

研究課題名(英文) Sophistication of local gene expression microscopy by adaptive optics

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：従来の生物学顕微鏡技術開発のコンセプトは、均一な媒質でできた理想的な検体を高解像度で撮影する方向で進められてきた。生物学研究では、生きたままの内部観察が重要になっているが、生体内に存在する屈折率の異なる物質による光の擾乱による深部像の劣化を回避できない。本研究課題では、非理想的な媒質が存在する生きた試料の観察が可能になる「補償光学」系を顕微鏡に導入し、観察と光による細胞操作法の高度化を目指した。近年オプトジェネティクスと呼ばれる光による細胞操作技術が発展しているが、それとは異なる熱ショック応答を利用した光による遺伝子発現顕微鏡技術(IR-LEGO法)に対しても補償光学を適用して高度化を進めた。

研究成果の概要(英文)：Current concept for development of biological microscopy supposes ideal sample that constitutes with homogeneous media for optics. A real living tissue, however, is constituted with heterogeneous media that have different refractive index for optics and they disturb wave front, and finally, an image in deeper area becomes blur. The current concept could not avoid this disturbance. Therefore, new concept is required for biological microscopy. In this project, we apply adaptive optics into microscopy to improve image blurring in deeper area in living tissues. And then, we also apply this technology to new microscope method that enables local gene expression by using heat shock response, called IR-LEGO. Temperature sensing method in living organisms is also required because the IR-LEGO uses invisible infrared light. It means improvement should be evaluated by 3D temperature mapping.

研究分野：イメージング、分子遺伝学

キーワード：顕微鏡 赤外レーザー 熱ショック 補償光学 遺伝子発現 遺伝子機能解析 個体 温度

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は生体内単一細胞遺伝子発現誘導顕微鏡 (IR-LEGO; infrared laser evoked gene operator) を開発(Kamei et al. Nat. Methods, 2009)し、様々な生物種での技術応用を行ってきた(Deguchi et al. Dev. Growth Differ., 2009; Kobayashi et al. Genesis, 2013 他)。生体内での局所遺伝子発現技術によって、発生期に機能する遺伝子を解析したり、細胞系譜を解析したりすることが可能となる。この顕微鏡技術を用いた共同研究を多数実施してきたが、大きな問題に直面した。線虫では、最大深度は 50 ミクロンであり、単一細胞での遺伝子発現は可能であった。メダカやゼブラフィッシュといったモデル小型魚類の胚における発現誘導では、およそ 80 ミクロンまでは単一細胞レベルでの誘導が可能であることを確認した(Shimada et al. Nat. Commun., 2013; Kimura et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2013)。しかし、ツメガエルの幼生においては、対象が大きく、共同研究における遺伝子発現の部位はさらに深くなり、単一細胞レベルでは不可能となった。モデル植物においても、茎頂組織内部など、複数細胞層を超える深部組織での発現誘導のニーズがあったが、発現誘導の効率が極端に低下する事態となった。IR-LEGO 法は、赤外レーザーを、顕微鏡を通して生体組織・細胞に照射して局所的に加熱することで熱ショック応答を誘導し、外来遺伝子発現を誘導するが、生体組織の深部では、レーザー光の集光が不安定になり、再現性が低下する。それ以前に、生体深部では標的細胞像自体が「ぼけ」によって同定が難しい。実はこの集光度低下と、像ボケは同じ要因により起こると推定される。生体組織中には屈折率の異なる物質が分布しており、光の波面を乱す原因となっているため、集光も結像も同様に乱されることになる。従来の顕微鏡設計や技術開発は、均質な媒質でできていることが前提となっており、開発コンセプト自体を変えなければならない。

2. 研究の目的

本研究課題では、波面を乱す媒質の存在を前提として、その乱れを検出し補償する機構として、天文学(望遠鏡技術)で発展してきた「補償光学」を顕微鏡技術に導入することで、生体深部の結像(観察像)のボケと、細胞操作のための光の集光の改善を行うことを目的とした。その為に、生体に存在する屈折率分布の特性を知り、それに合った補償光学系を設計する。また、補償光学系導入による像の改善の評価方法として、観察像は一般に明視野像、蛍光像として検出できるので、カメラによる撮像で評価できるが、IR-LEGO 法では、赤外線を集光させるためにカメラによる撮像は難しい。そこで、赤外光集光による温度上昇の分布を評価することで集光度改善を評価することとした。その為に、生

体内での温度計測技術に関しても同時に開発する必要があった。

3. 研究の方法

初めに、生体内の屈折率分布を推定するために、生体試料を位相差顕微鏡により観察し、位相の変化を z 軸方向で解析した。さらに、z 軸方向深部における点像分布関数 (PSF) も解析した。これらデータを元にして、補償光学系設計を行い、必要なデバイスのスペックを決定し、まずは「観察」の改善を目的とした光学系を構築した。

IR-LEGO 法は、入射系、つまり、集光度の改善を必要とするため、天体望遠鏡技術では使用されていない入射レーザー光の補償光学系を構築することが必要となるが、基本的に光学系では、方向が異なっても光の特性として同じふるまいとなるため、観察像の改善はそのまま集光の改善となる。そこで、観察系に導入した光学系のカメラ直前のフリー面に相当する部分から、平行レーザー光を導入することで、集光も改善されるはずである。赤外光の集光度はカメラでは検出できないので、まずは、可視光レーザーにより集光度改善を確認した。

赤外光の集光度評価のための生体内温度計測系を確立するために、温度計測蛍光タンパク質プローブの開発も進めた。

また、IR-LEGO の応用研究として、複数の共同研究を進めながら、本技術のニーズをしっかりと捉えることも行った。

4. 研究成果

生体内部に存在する屈折率の異なる媒質の分布に関して、動物・植物を対象として解析を行ったところ、特に植物における葉緑体が大きな光の擾乱媒質であることを突き止め、論文として光学系の専門誌に発表した(Tamada et al. Int. J. Optomechatoroni., 2014)。動物組織における評価として IR-LEGO での応用で、およそ 50 ミクロンの深さでの単一細胞遺伝子発現が可能であることをツメガエルにおいて確認した(Hayashi et al. Dev. Biol., 2014)。また、同動物においてさらに深部(100 ミクロン以上)においては、深部に遺伝子発現させる為にはレーザーの出力を上げる必要があり、これは逆に浅部における過剰な加熱となり、特に照射中心軸部分の細胞死を引き起こす事が分かった(Kawasumi-Kita et al. Dev. Growth Differ., 2015)。また、モデル植物であるゼニゴケにおいても単一細胞レベルでの遺伝子発現誘導が可能とも確認した(Nishihama et al. Plant Cell Physiol., 2016)。

IR-LEGO 法は、基本的に遺伝子発現誘導のために開発した技術ではあるが、赤外レーザーの出力を適当なレベルで照射すれば熱ショック応答を引き起こし、過剰なレーザー出力を照射することで、細胞焼殺(レーザーアブレーション)も可能である。この場合におい

ても、単一細胞レベルでのアブレーション技術は発生生物学分野においても有用である。そこで、モデル動物であるゼブラフィッシュにおける単一細胞アブレーションがどの程度の深さまで可能であるかを、共同研究で実施し、およそ100ミクロンまで可能であることを、そして、短時間(ミリ秒)の高出力(80 mW)が有効であることが分かった(Zeng et al. Biol Cell, 2016)。

温度計測プローブの開発に関しては、IR-LEGOを開発した際には、蛍光タンパク質であるEGFPを利用し、相対温度上昇により加熱状況の評価したが、今回は温度感度を上げることと、絶対温度計測を可能にするために、レシオメトリックに計測する方法として、蛍光強度の温度感受性の異なる2種類の蛍光タンパク質を用いて、1波長励起・2波長検出が可能な方法を開発した。これにより、赤外レーザー照射に伴う急激な温度上昇をリアルタイムで計測する系を確立することができた(Nakano et al. PLoS ONE, 2017)。

補償光学顕微鏡光学系での入射レーザーの集光度評価に関しては、可視光ではおよそ2倍の集光度改善が見られた。今後は、赤外レーザーでの補償光学系の評価として、今回開発した温度計測蛍光タンパク質プローブを用いて評価し、IR-LEGOの高度化を達成したい。

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 13件)

(1) Nakano, M., Arai, Y., Kotera, I., Okabe, K., Kamei, Y. and Nagai, T. Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response. PLoS ONE, 査読有り, 12, (2017) e0172344 DOI; 10.1371/journal.pone.0172344

(2) 亀井保博, 光を使った生物研究技術(IR-LEGO)とその応用例, 日本プランクトン学会報, 査読有り, 64, (2017) 77-80. (DOI; 無)

(3) Zeng, C.W., Kamei, Y., Wang, C. T. and Tsai, H.J. Subtype of hypoxia responsive cells differentiate into neurons in spinal cord of zebrafish embryos after hypoxic stress. Biol. Cell, 査読有り, 108, (2016) 357-377. DOI; 10.1111/boc.201600015

(4) Kawasumi-Kita, A., Hayashi, T., Kobayashi, T., Nagayama, C., Hayashi, S., Kamei, Y., Morishita, Y., Takeuchi, T., Tamura, K. and Yokoyama, H. Application of local gene induction by infrared laser-mediated microscope and temperature stimulator to amphibian regeneration study. Dev. Growth Differ., 査読有り, 57, (2015) 601-613. DOI; 10.1111/dgd.12241

(5) Hayashi, S., Ochi, H., Ogino, H.,

Kawasumi, A., Kamei, Y., Tamura, K., Yokoyama, H. Transcriptinal regulators in the Hippo signaling pathway control organ growth in *Xenopus* tadpole tail regeneration. Dev. Biol., 査読有り, 396, (2014) 31-41. DOI; 10.1016/j.ydbio.2014.09.018

(6) Tamada, Y., Murata, T., Hattori, M., Oya, S., Hayano, Y., Kamei, Y. and Hasebe, M. Optical property analysis of plant cells for adaptive optics microscopy. Int. J. Optomechatoroni., 査読有り, 8, (2014) 89-99. DOI; 10.1080/15599612.2014.901.901455

[学会発表](計 15件)

(1) 亀井保博, 赤外レーザー局所加熱による生体内単一細胞遺伝子発現誘導とその応用、分子観察による生命の階層横断的な理解(分子研シンポジウム)(招待講演) 2017年3月21日-22日(分子科学研究所、愛知県岡崎市)

(2) 亀井保博, 生体内の単一細胞に遺伝子発現誘導する顕微鏡技術のメダカへの応用、環境毒性化学とメダカに関する研究会 around 九州(日本環境化学会九州地区部会)(招待講演) 2016年9月17日-18日(熊本大学、熊本県熊本市)

(3) 亀井保博, 光を使って生体内の単一細胞に遺伝子発現を誘導する技術とその共同利用による応用研究の紹介、海洋生物の適応戦略(東京大学大気海洋研究所共同利用シンポジウム)(招待講演) 2016年9月15日-16日(東京大学大気海洋研究所、千葉県柏市)

(4) 亀井保博, 光を使って生体内の1細胞にて遺伝子発現誘導する技術、静岡ライフサイエンスシンポジウム(招待講演) 2016年3月25日(静岡大学、静岡県静岡市)

(5) 亀井保博, 光を使った生物研究技術の紹介と共同利用精度の紹介、日本プランクトン学会(春季シンポジウム)(招待講演) 2016年3月14日(東京大学、東京都文京区)

(6) 亀井保博, 生体内の1細胞の遺伝子発現を顕微鏡で操作する、宇都宮大学オプトバイオシンポジウム(招待講演) 2015年12月21日(宇都宮大学、栃木県宇都宮市)

(7) 川住愛子、亀井保博, 局所遺伝子発現技術(IR-LEGO)の原理と応用、次世代両生類研究会(招待講演) 2015年8月24日-25日(岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市)

(8) 亀井保博, 局所遺伝子発現法(IR-LEGO)の様々な生物種への応用、日本分子生物学会、2014年11月27日-2014年11月27日(パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

(9) Yosuke Tamada, Masayuki Hattori, Takashi Murata, Yutaka Hayano, Shin Oya, Shigenori Nonaka, Yasuhiro Kamei and Mitsuyasu Hasebe, Establishment of adaptive optics microscopy for the single nucleus live imaging of chromatin

modifications in the moss *Physcomitrella patens*. MOSS2014: The 17th annual moss international conference, 2014年9月25日 (Beijing, China)

(10) 亀井保博、横山仁、川住愛子、森下喜弘、林利憲、木村英二、島田敦子、竹内秀明、赤外線による局所遺伝子発現法 (IR-LEGO) の様々な生物種への応用、日本動物学会、2014年9月11日-13日、東北大学 (宮城県仙台市)

(11) 早野裕、玉田洋介、服部雅之、村田隆、大屋真、亀井保博、長谷部光泰、すばる望遠鏡レーザーガイド星補償光学と生体イメージングへの応用、日本バイオイメージング学会、2014年9月6日 (大阪大学、大阪府吹田市)

(12) 亀井保博、赤外レーザーによる生体内局所遺伝子発現法 (IR-LEGO) レーザー加工学会 (招待講演) 2014年5月27日、大阪大学 (大阪府吹田市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

研究室ホームページ
<http://www.nibb.ac.jp/lspectro/>
リサーチマップ
<http://researchmap.jp/ykamei/>

アウトリーチ活動

(1)2017年3月9日、日本再生医療学会大会における高校生を対象としたアウトリーチ活動 (両生類を使った再生研究の紹介)

(2) 研究室 (施設) の紹介・見学 (高校生、大学生等) を年間数回実施

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

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

服部 雅之 (HATTORI, Masayuki)

基礎生物学研究所・生物機能解析センター・研究員

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

(4)研究協力者

()