

光学顕微鏡で生細胞の内部を観て測る

(独)理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー
(独)科学技術振興機構・さきがけ『iPS細胞と生命現象』領域
大阪大学大学院・生命機能研究科・招聘准教授
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・招聘准教授
(株)ジーオングストローム・取締役

渡邊 朋信

理研QBiC先端バイオイメージングチーム

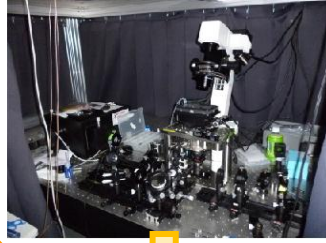
Superresolution



Nonlinear photonics



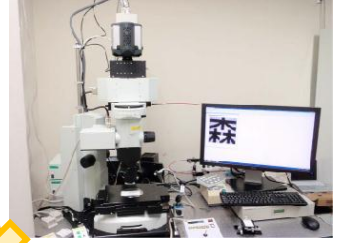
Raman spectroscopy



2P in incubator



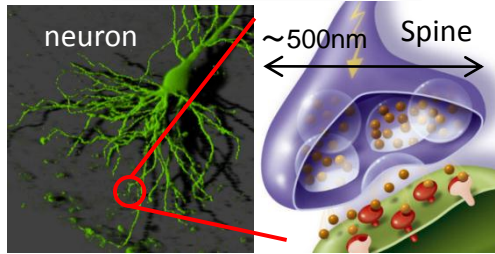
NIR optics



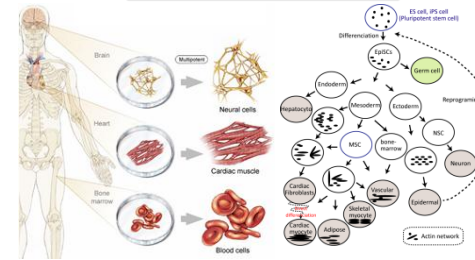
MR technology



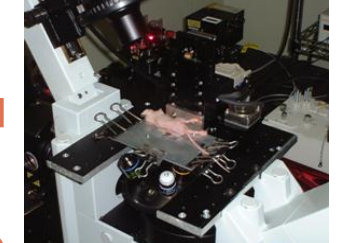
Biology in nanoscale



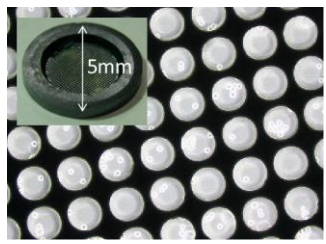
iPS differentiation



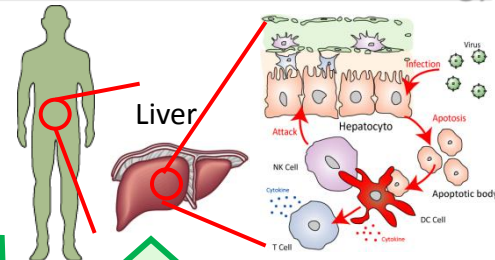
In vivo single molecule



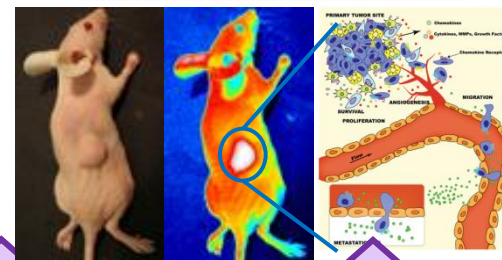
Microfabrication



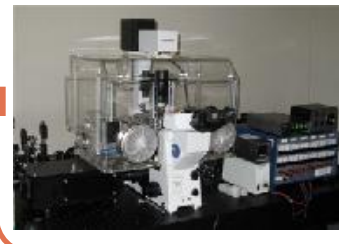
Cell-cell interaction in Immunology



Cancer metastasis in vivo



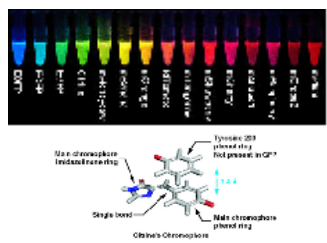
Single molecule



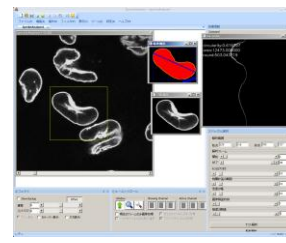
ES/iPS cells



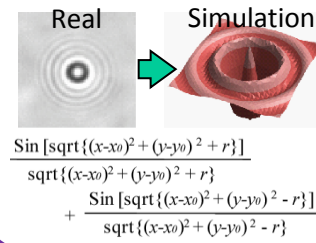
Fluorescent Proteins



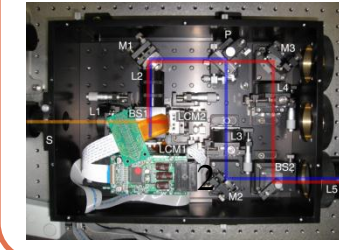
Quantitative analysis



Numeric analysis



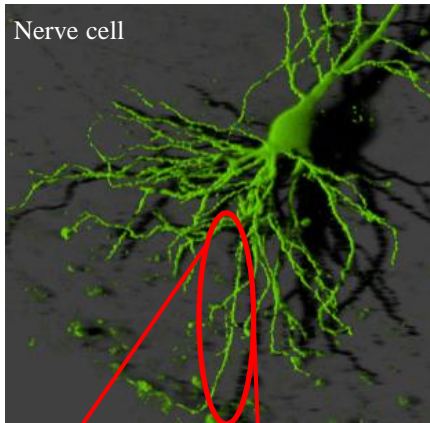
Optical system



マイクロドメイン構造内の素子間の挙動・相互作用を観察する

蛋白質を素子をした時のドメイン構造の大きさは、数 μm 以下である。

神経細胞のスパン



サブミクロンスケールの構造体の中
に含まれる蛋白質の量は、 ~ 1 万個。



このスケールになると、濃度の概念
が通じない。



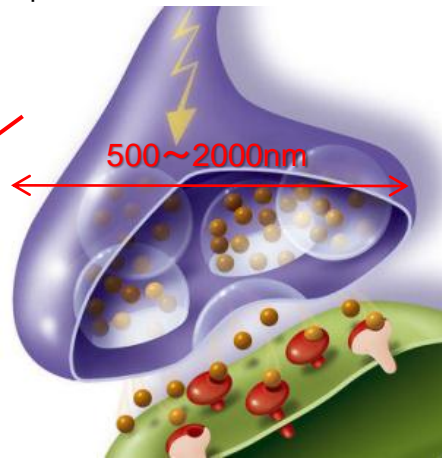
一つ一つを測らなければならない。

Dendrite

Spine

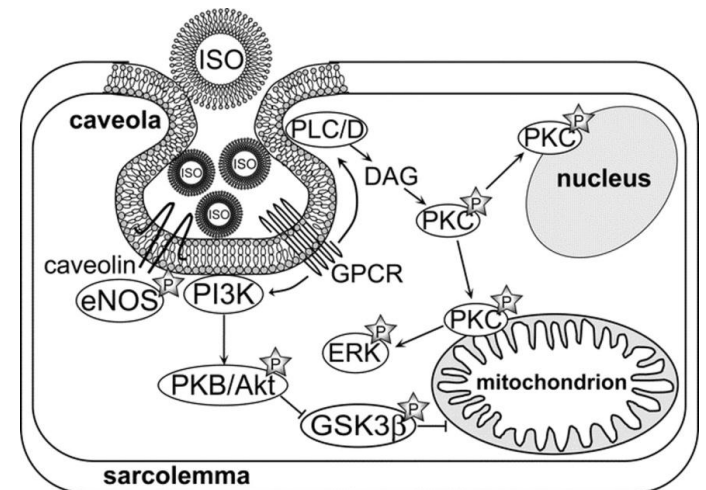
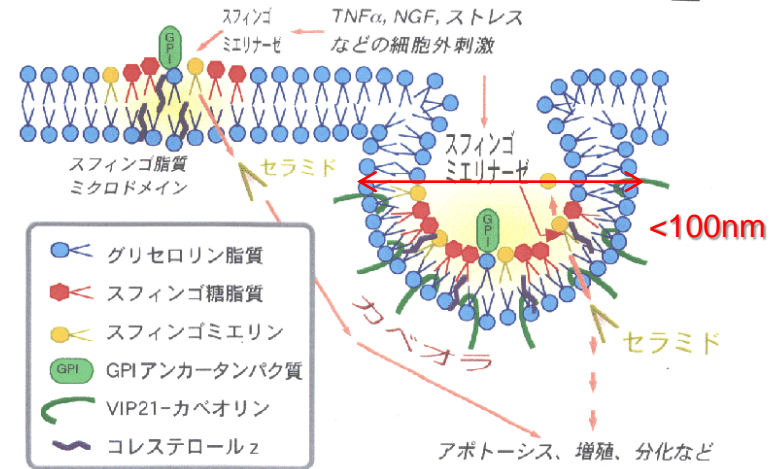


10 μm



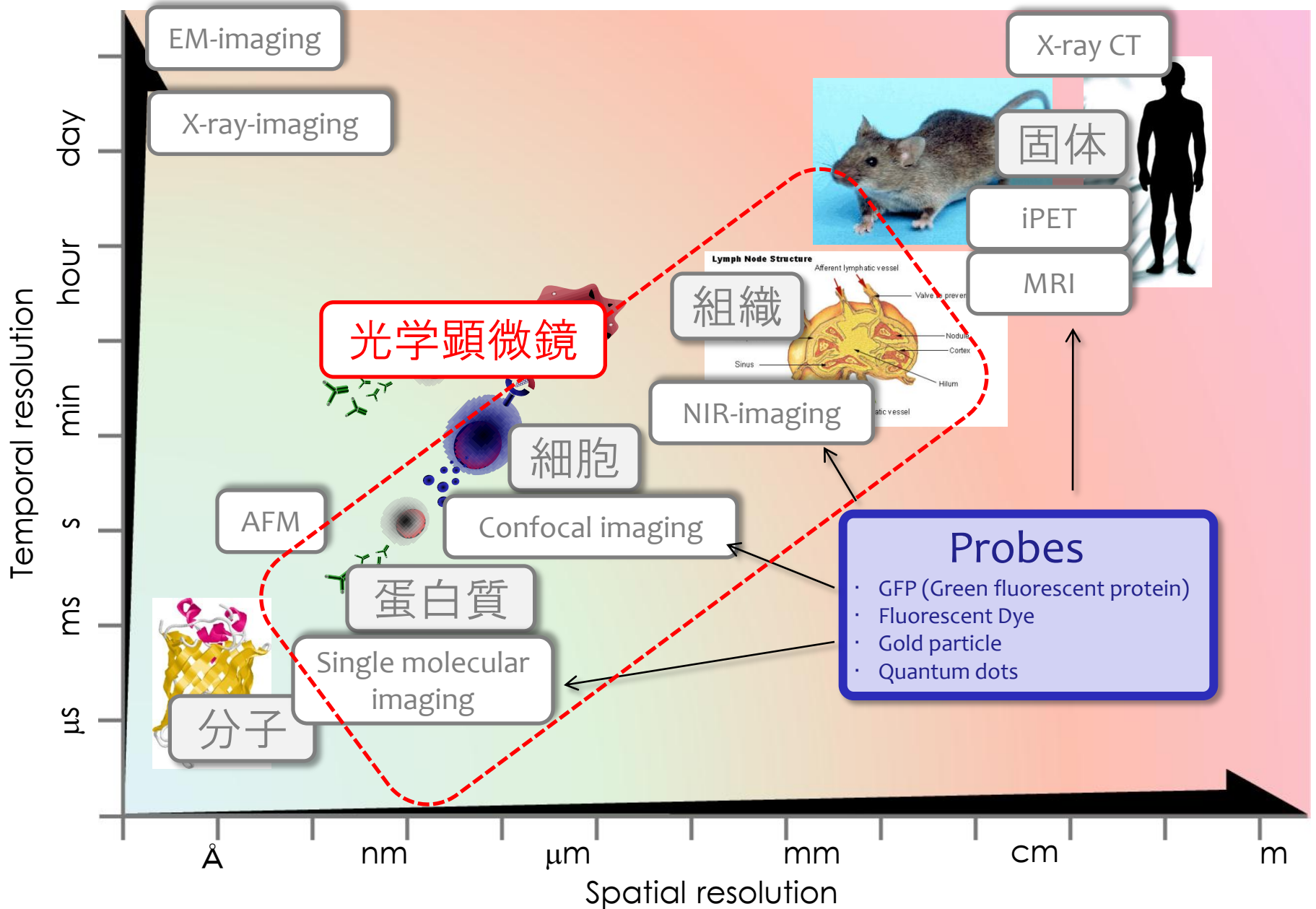
500~2000nm

ラフト構造(カベオラ)



ナノ構造体内の生命現象を観察するための、**バイオイメージング技術**を開発する。

バイオイメージング

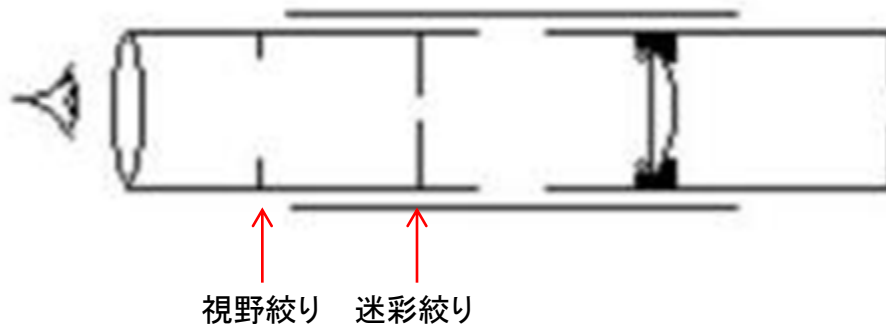


光学顕微鏡

■ ヤンセン製の顕微鏡(1595年)



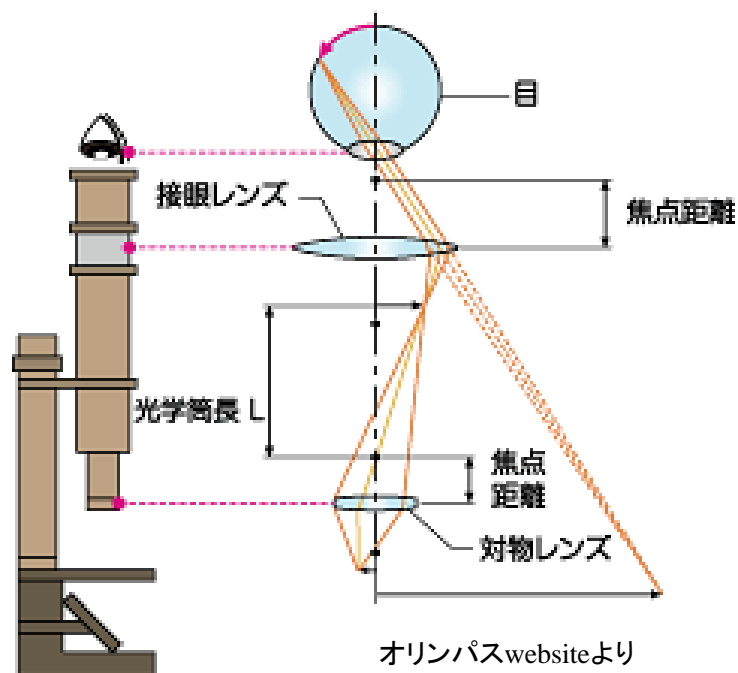
■ ヤンセン製の顕微鏡の仕組み



■ ツァハリアス・ヤンセン(1588-1632)



■ 現代の顕微鏡の仕組み

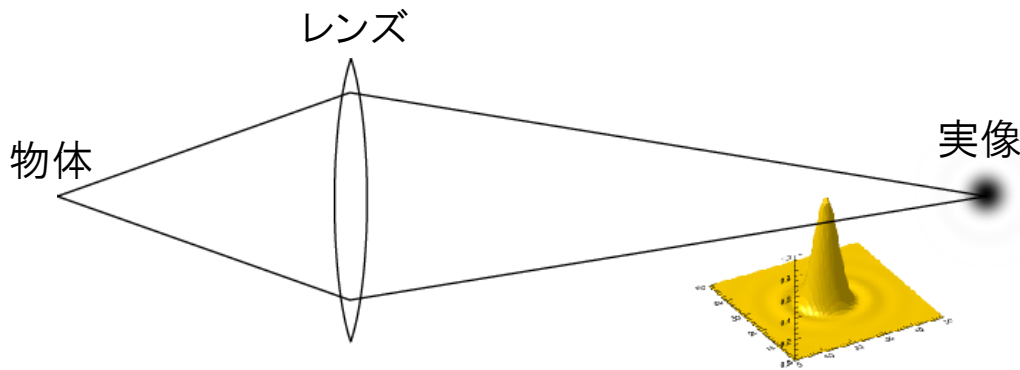


オリンパスwebsiteより

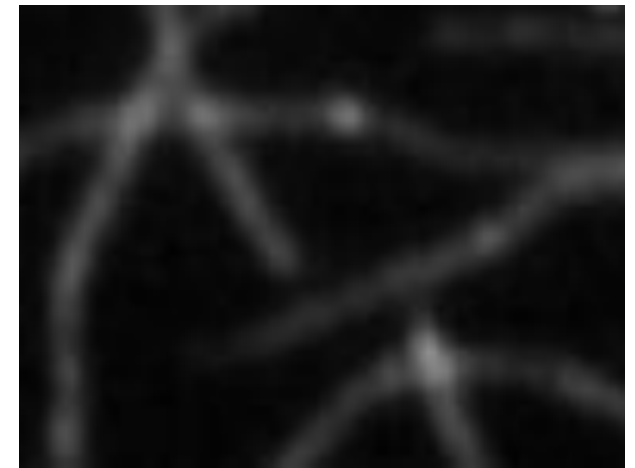
光学顕微鏡における分解能

回折限界

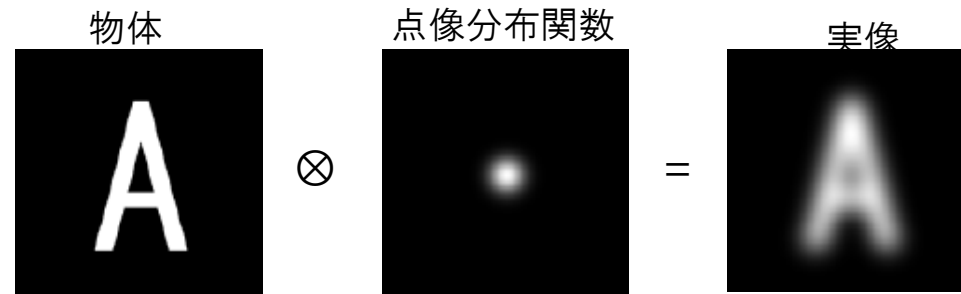
光は波なので、無限に小さい点光源は、レンズで集光しても、波長の半分程度の直径の大きさに広がってしまう。



■ アクチンフィラメントの蛍光像



1 μm

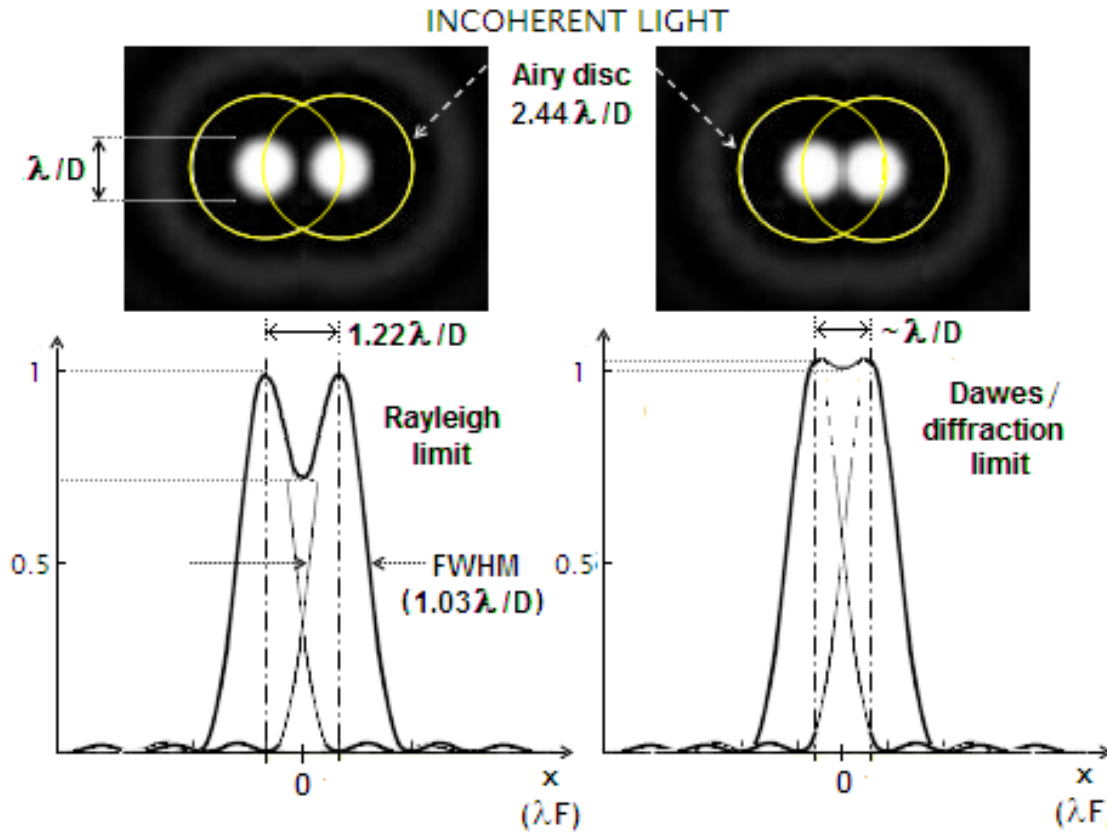


太さ10nm程度のアクチンフィラメントでも、300nm程度にまで滲んでしまう。

光学顕微鏡における分解能

分解能は、レンズの開口数(NA)と色(波長)で決定する。

■ 顕微鏡の分解能



レイリーの分解能公式

$$\delta = \frac{0.61 \times \lambda}{NA}$$

← 対物レンズの開口数

$$= 224 \text{ nm}$$

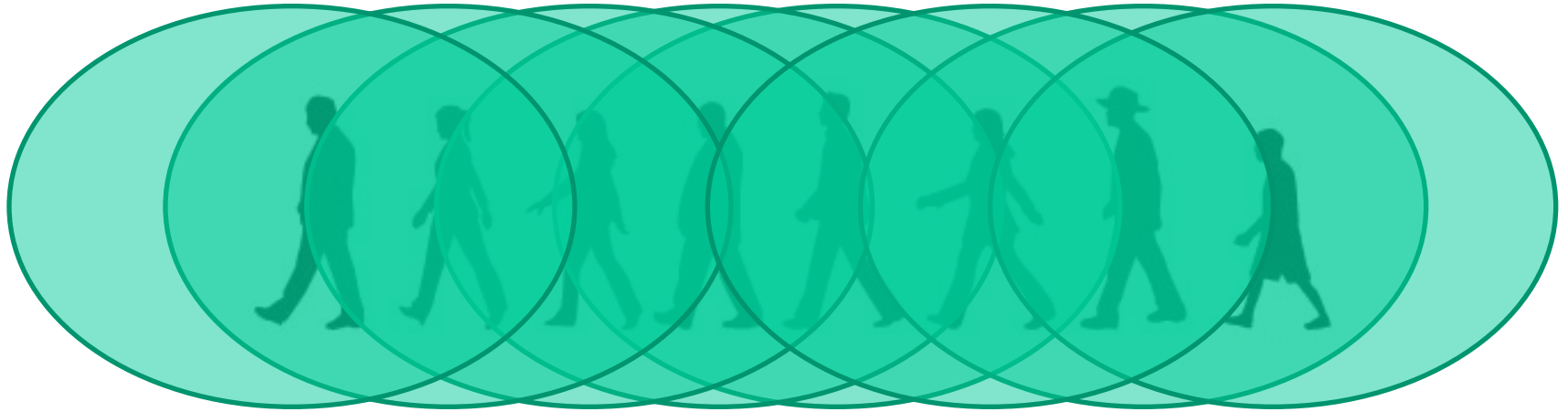
($\lambda=533, NA=1.45$)

2つの光源の間隔が、回折による滲みより小さいと、2点に分離されない。

本日のテーマ

分解能は、**200nm**程度。

しかし、蛋白質は、
数～数十nmオーダーの構造で、
数～数十nmオーダーの運動を行っている。



個性も大きさも全て隠れてしまう。

光で分解能以下の情報を取得する。

単粒子ナノ計測の基本コンセプト

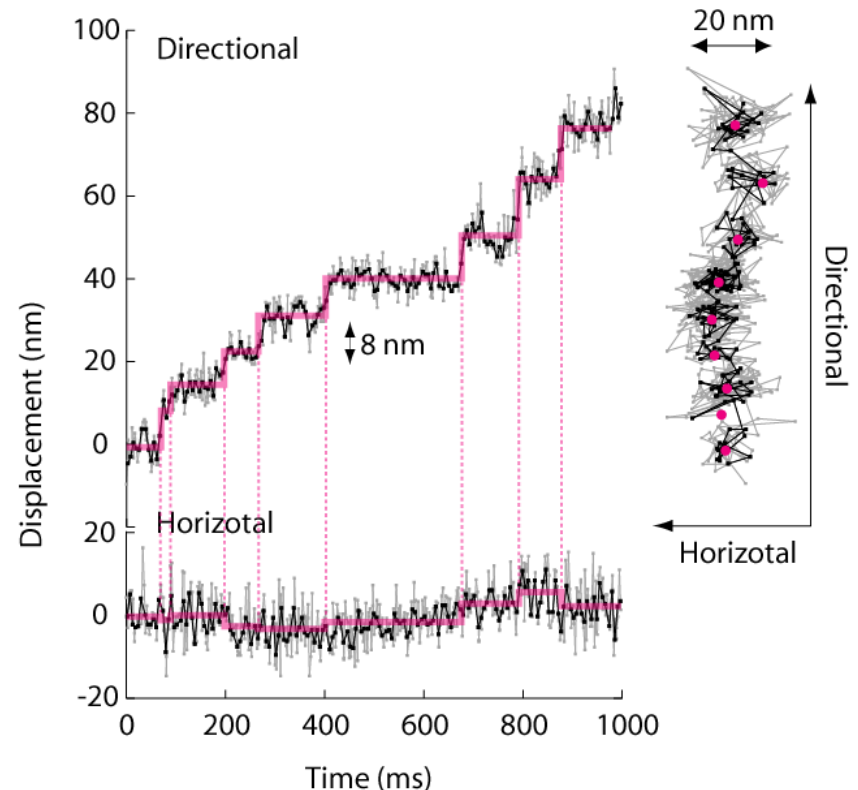
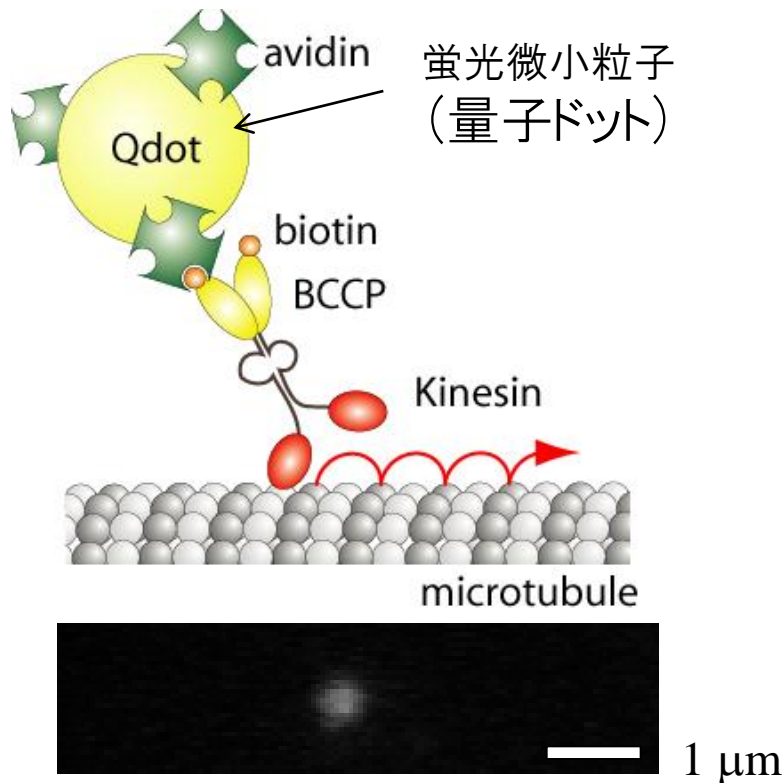
近接する2点を“同時”に区別することは不可能



1点なら、その位置を回折限界を超えて取得できる。

①一つだけ蛍光色素を結合させる。

②重心位置は、nm精度で計測できる。



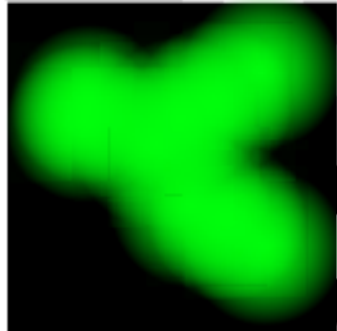
単粒子ナノ計測法を用いて回折限界を破る

一画面に数個しか蛍光色素が光らない状態を作る

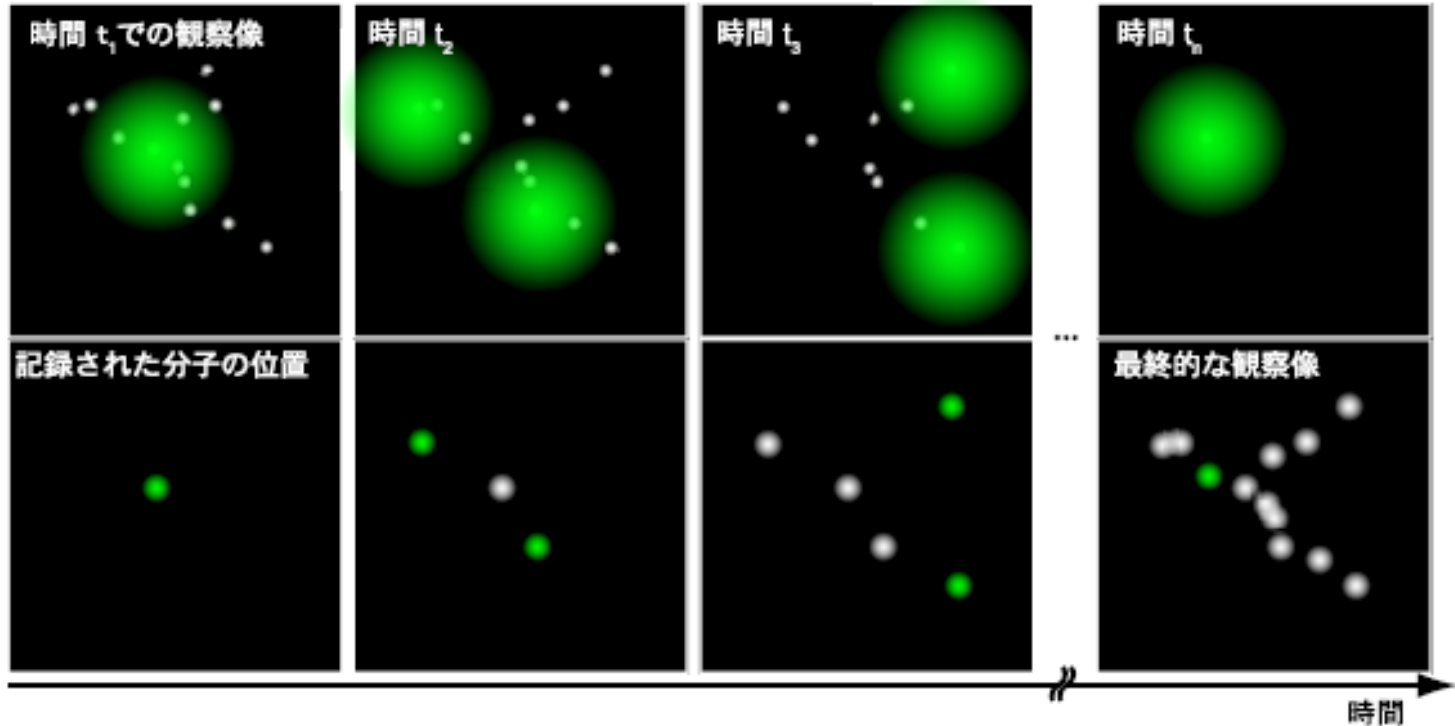


単粒子ナノ計測法を用いて、色素の位置を正確に測る。

(a) 従来の蛍光顕微鏡像



(c) PALM/STORMによる観察 (分子を個別に発光させ、その位置を記録)

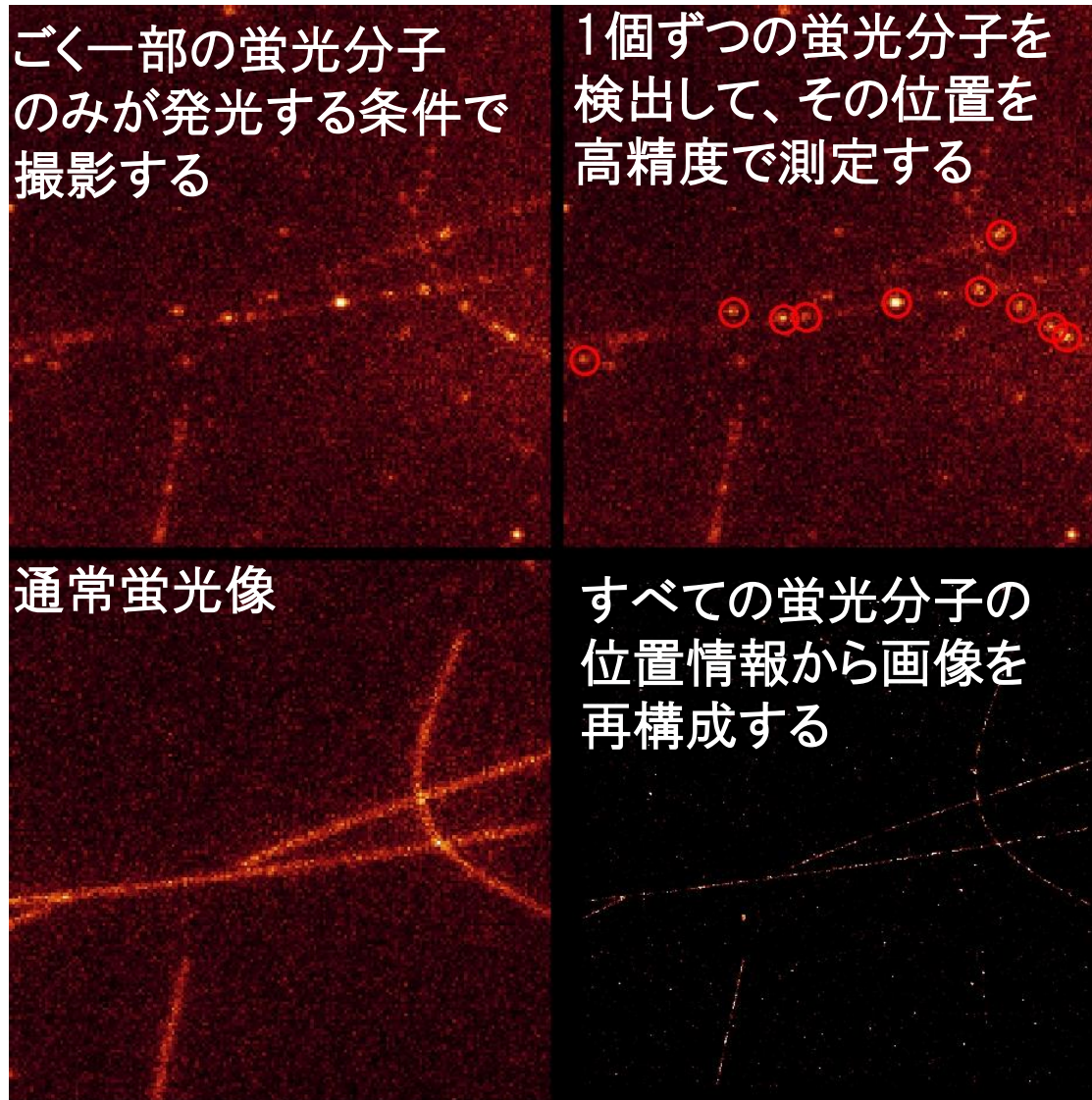


(b) 実際の分子の分布



単粒子ナノ計測法を用いて回折限界を破る

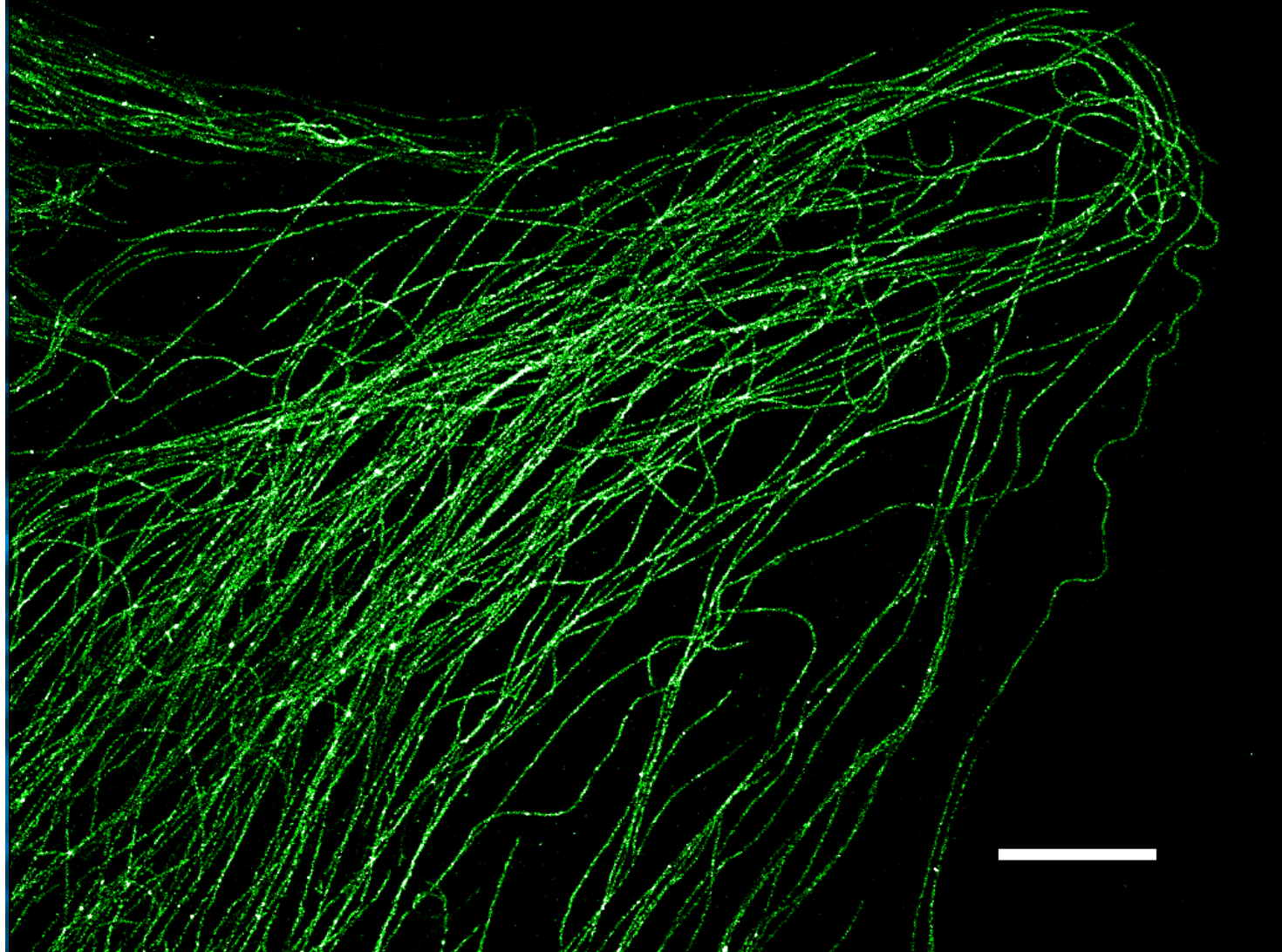
■微小管をローダミン色素で標識した実例



(独)理研・QBIC 岡田康志先生により頂きました。

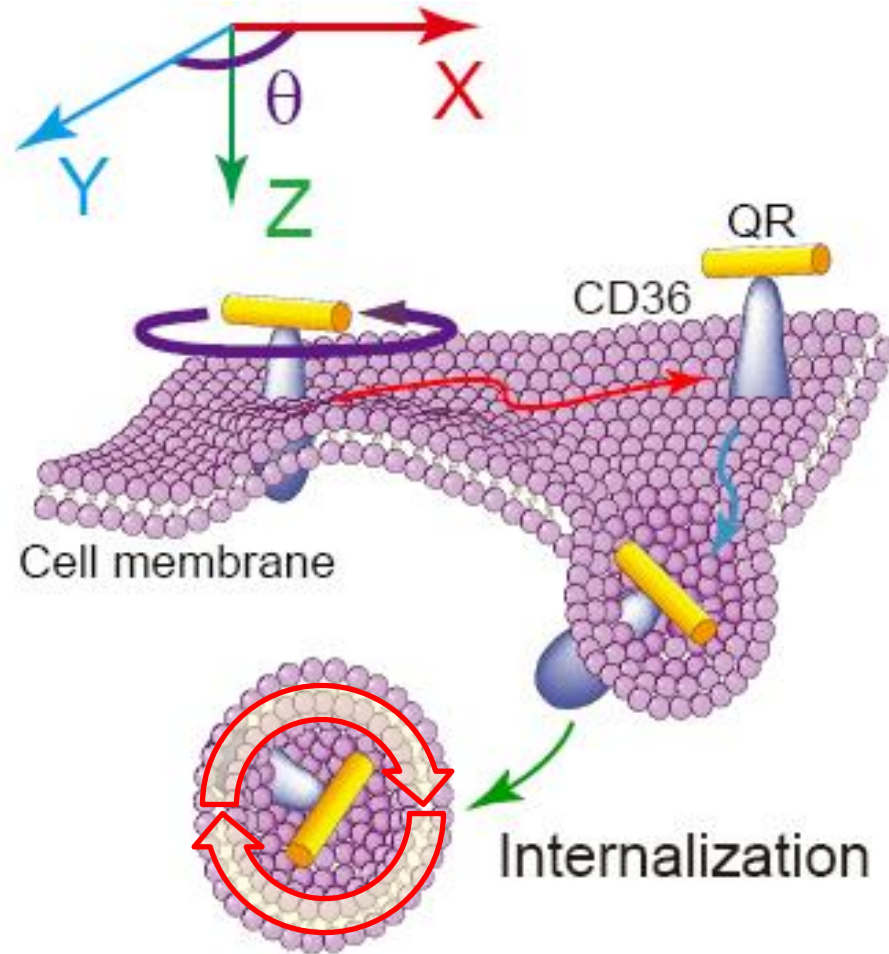
単粒子ナノ計測法を用いて回折限界を破る

微小管のナノイメージング像 (40,000 フレーム, 1,502,569分子)



単粒子ナノ計測の四次元化

蛋白質は、三次元運動のほかに回転運動も行っている

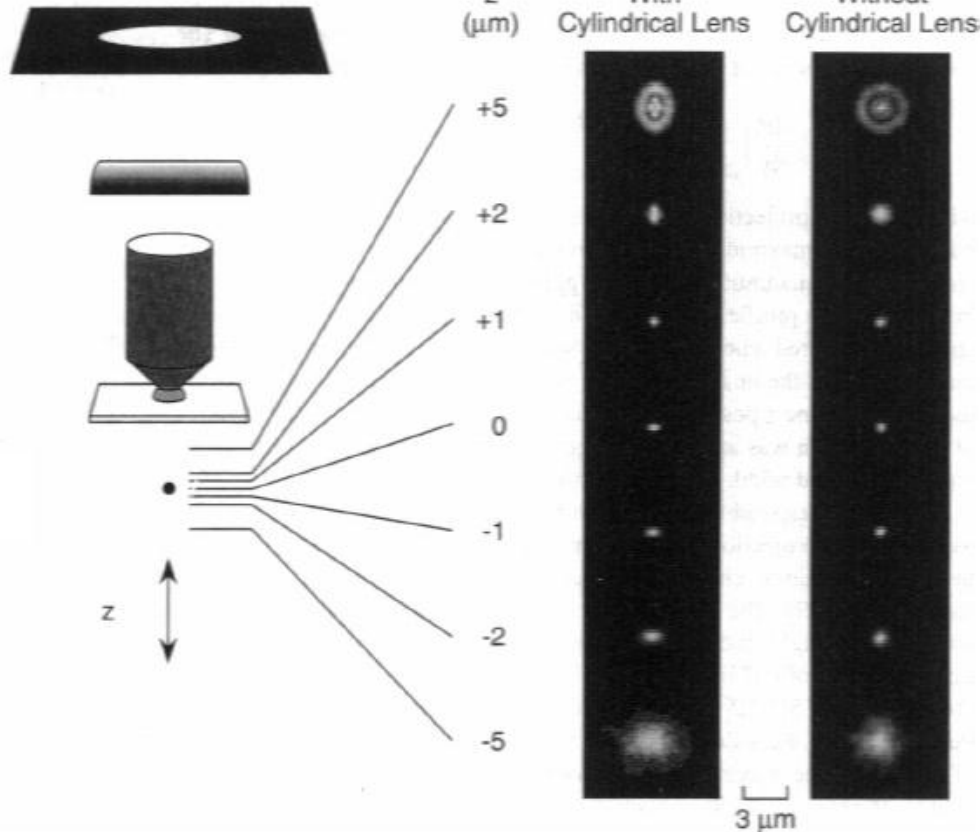


↓
四次元単粒子追跡技術の開発

シンドリカルレンズを用いた3次元粒子追跡法

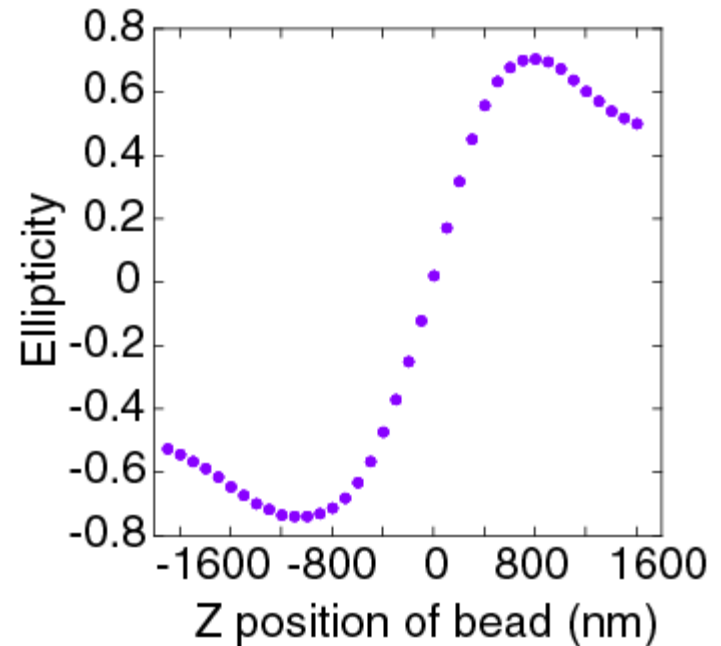
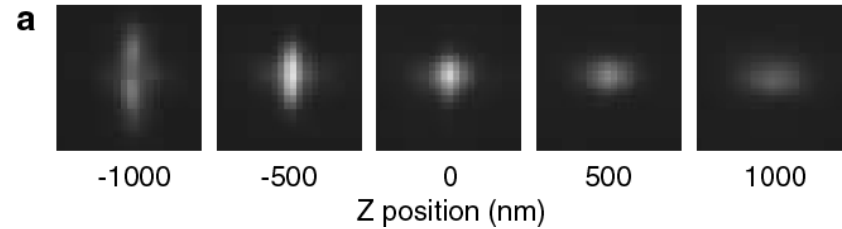
対物レンズ後方にシンドリカルレンズを挿入し、輝点を楕円化する。

■ 原理



HP Kao & AS Verkman, Biophysical journal, 1994

■ 実際の実験

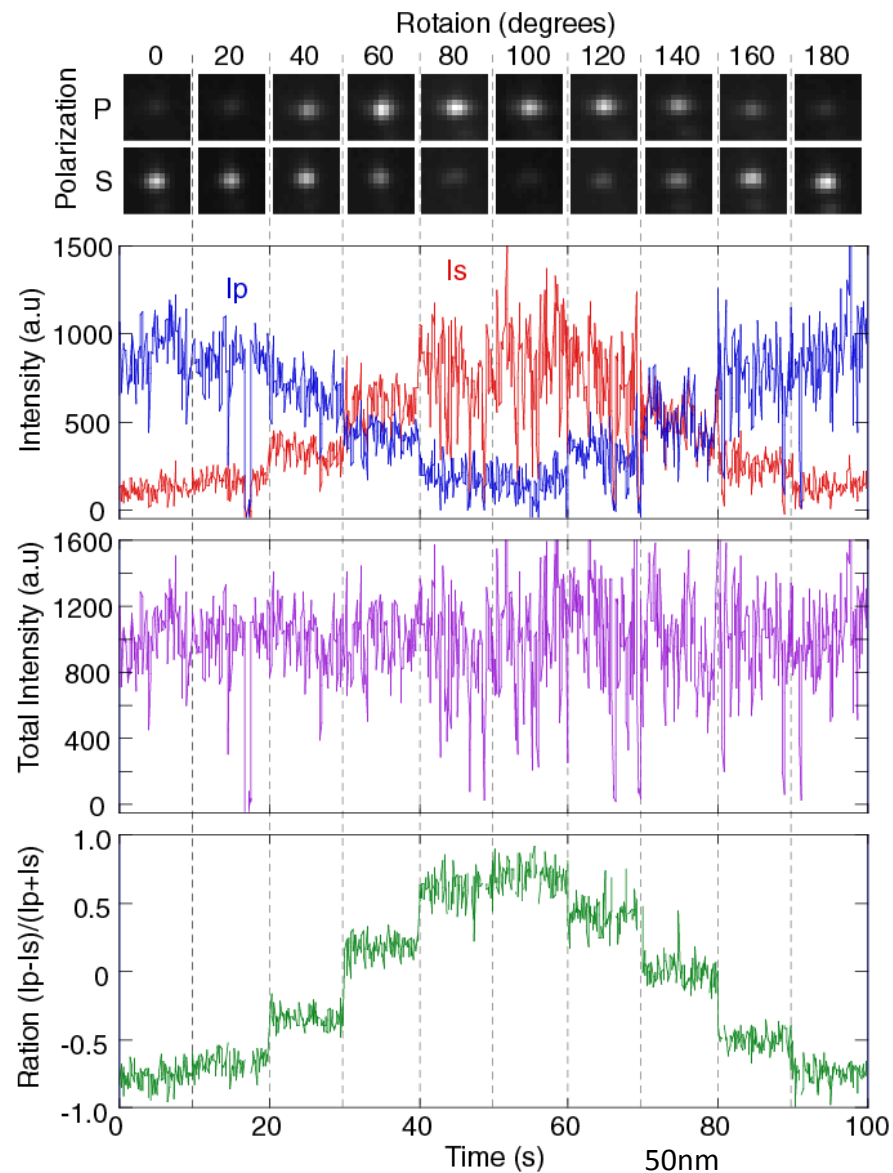
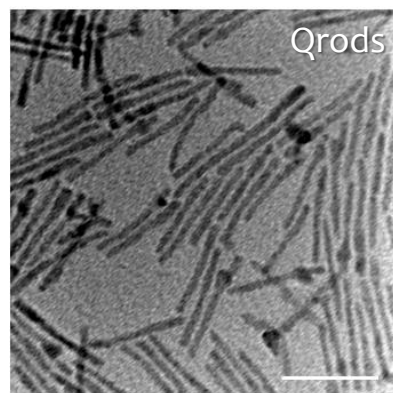
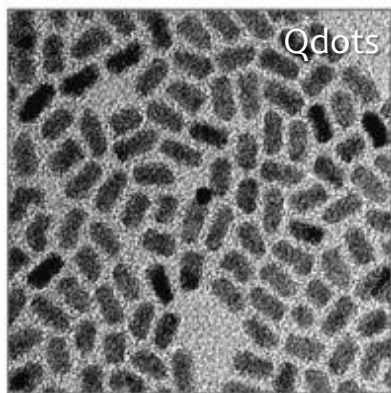
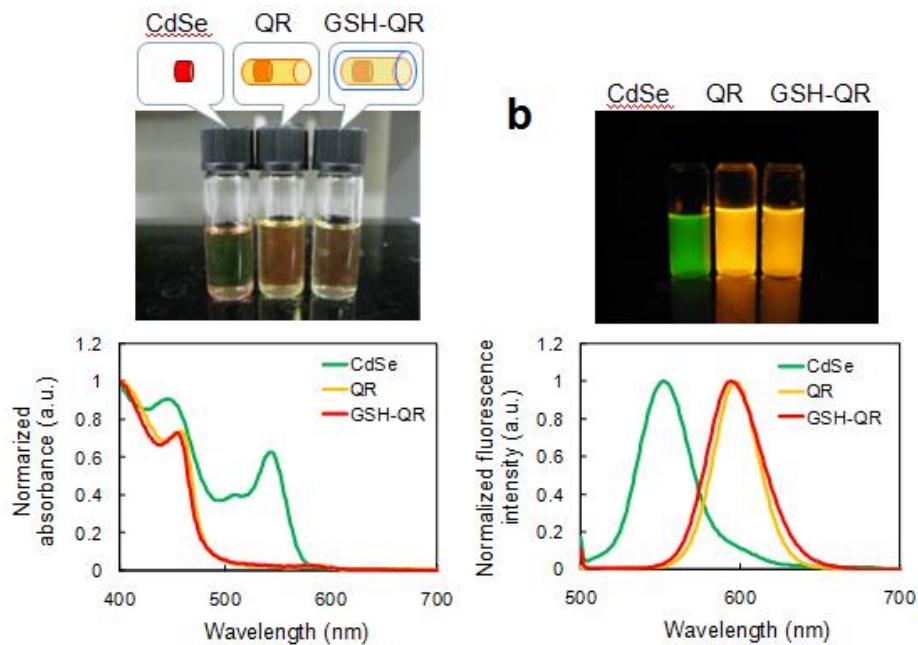


蛍光粒子のZ位置は、輝点の楕円率から求めることができる。

蛍光粒子の偏光による4軸目(回転, θ)の取得

蛍光粒子の角度位置は、偏光異方性によって計測できる。

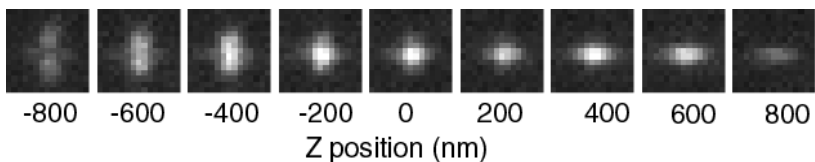
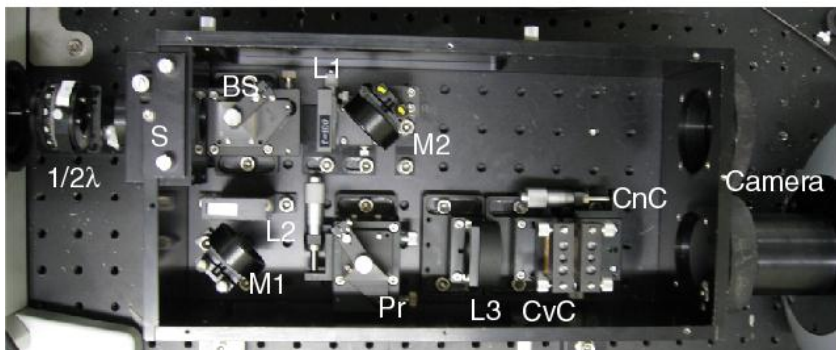
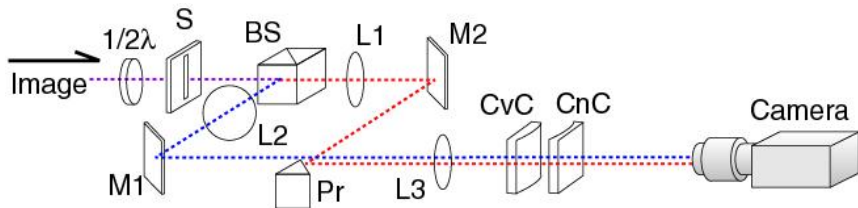
■ 偏光性量子ロッド (Qrods)



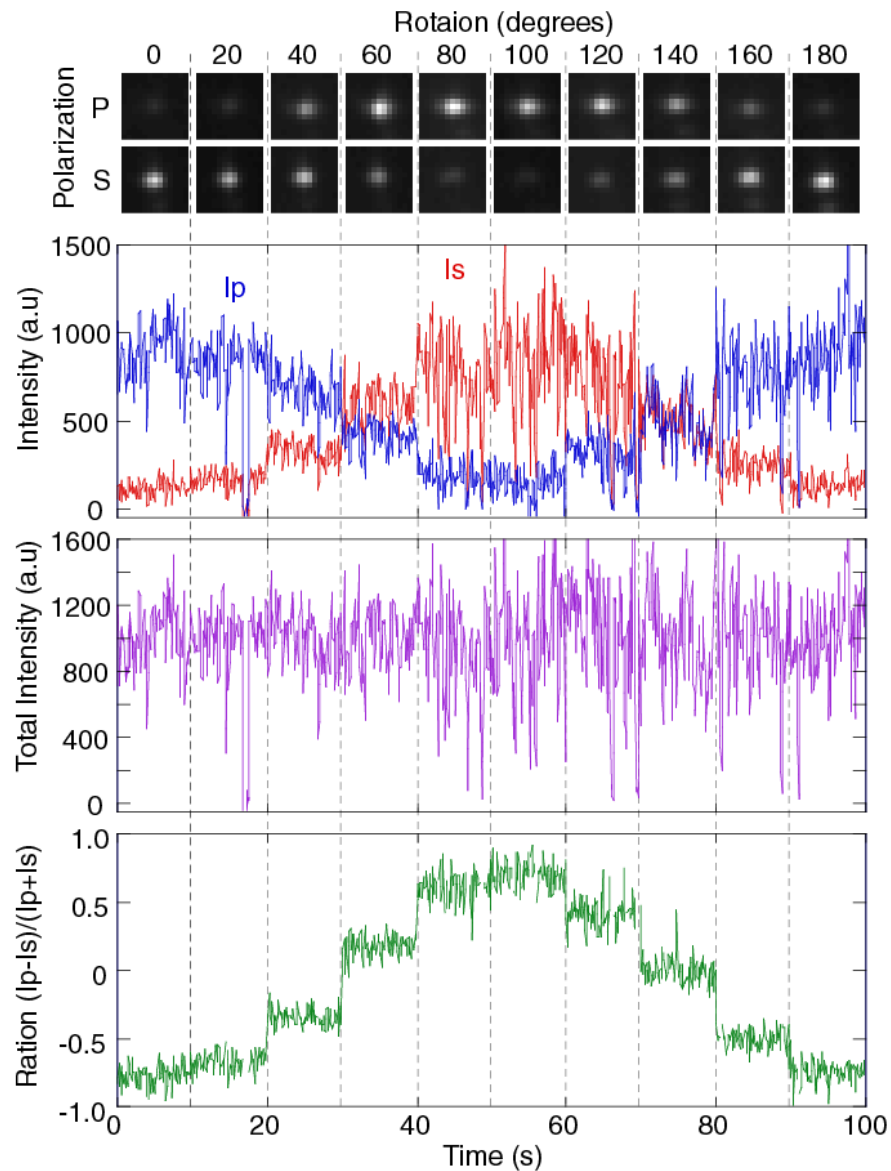
四次元(xyz- θ)単粒子追跡法;

シンドリカル光学と偏光光学をひとつの光学系として構築

■ 我々が構築した光学系

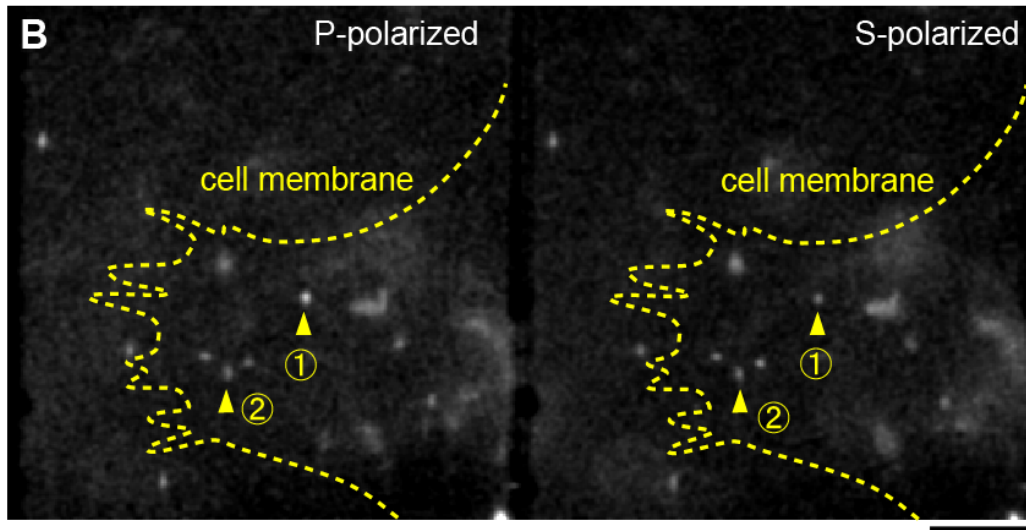
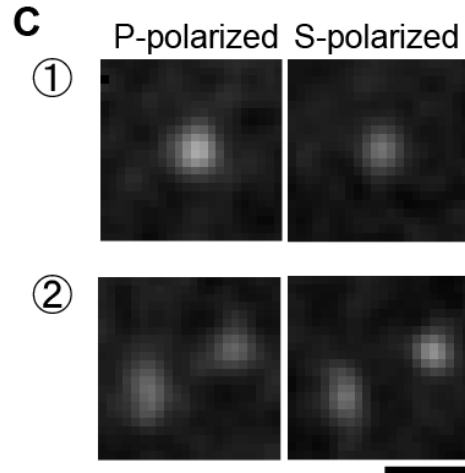
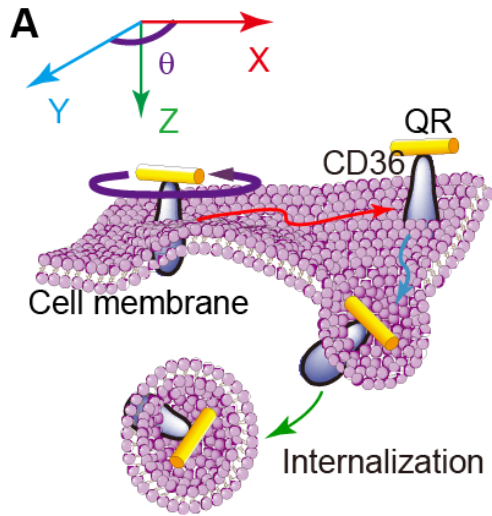


- X, Y → 輝点の中心位置 (5 nm)
- Z → 楕円率 (17 nm)
- q → 偏光度 (6 degree)

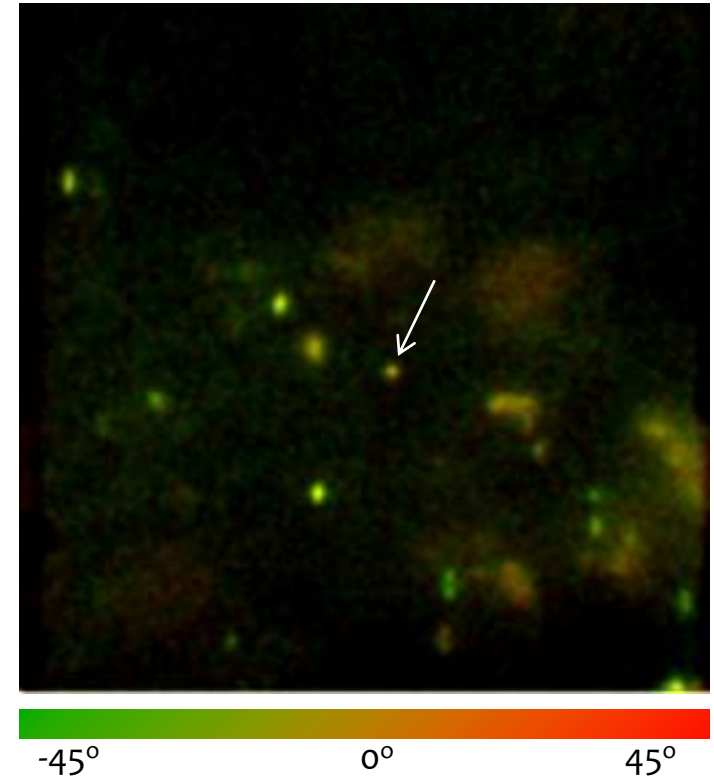


膜蛋白質の四次元(xyz- θ)追跡

量子ドットを膜蛋白質に結合させ、その運動を四次元で追跡



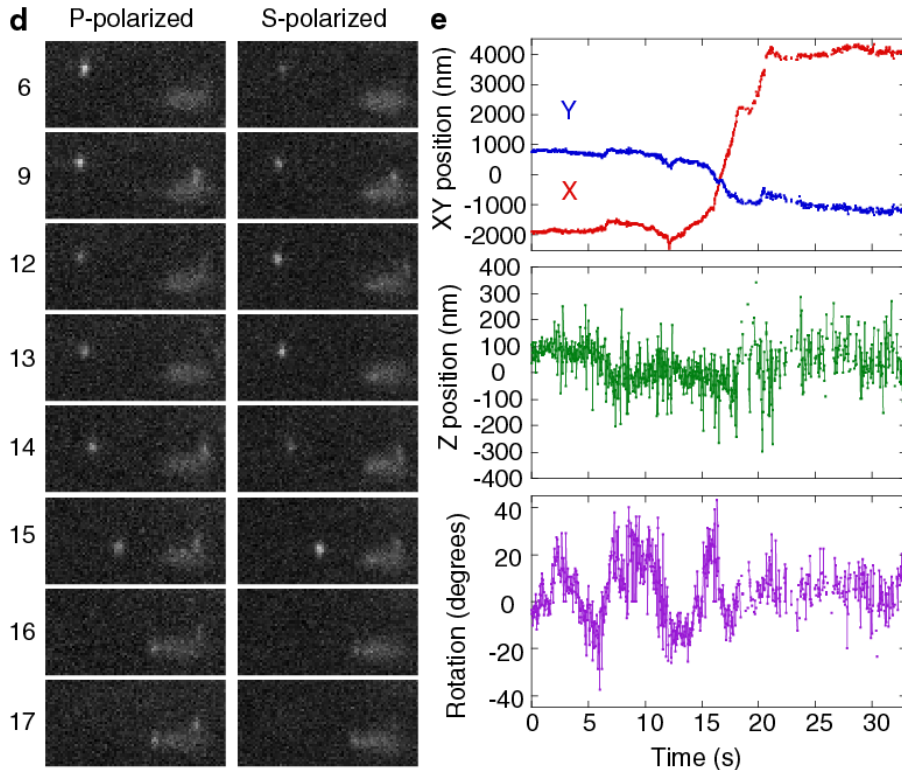
■ 回転を色で示した動画



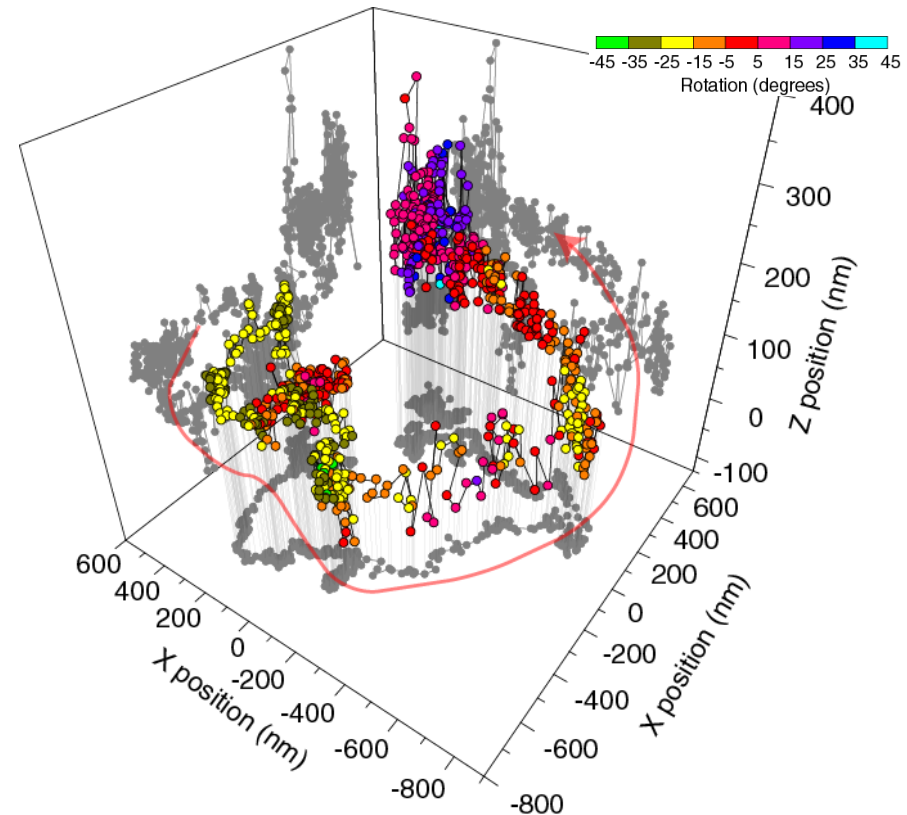
膜蛋白質の四次元(xyz- θ)追跡

膜蛋白質の運動を四次元で追跡することに成功した

■ 膜蛋白質輸送中の回転運動



■ エンドサイトーシス時の回転運動



新規**蛍光プローブの開発**、新規**光学系の構築**を融合させることで、複雑な原理・装置を用いることなく、蛋白質の**四次元追跡**が可能。

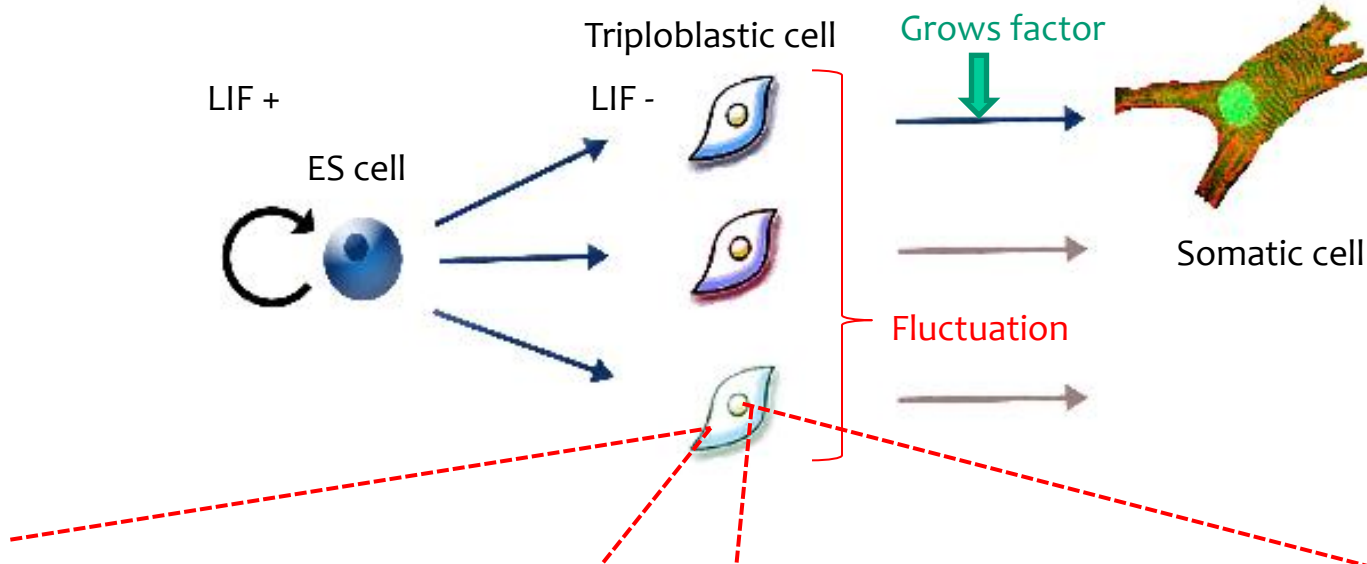
本日のテーマ

光で分解能以下の情報を取得する。

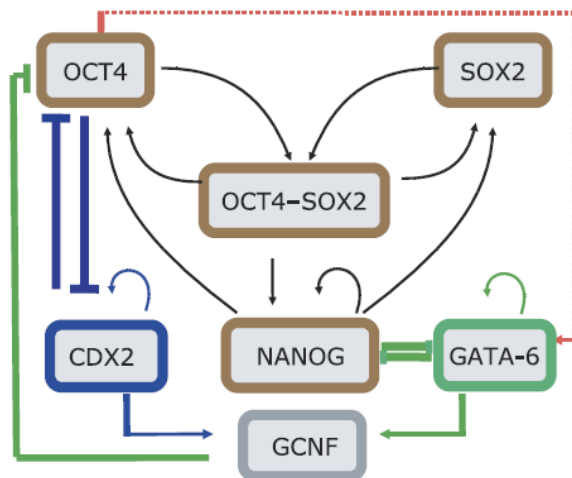
- ① 一点の『位置』であれば、nm精度で計測可能
シリンドリカル光学と偏光光学により、四次元化。

細胞の中の『状態』を観察することができるか？

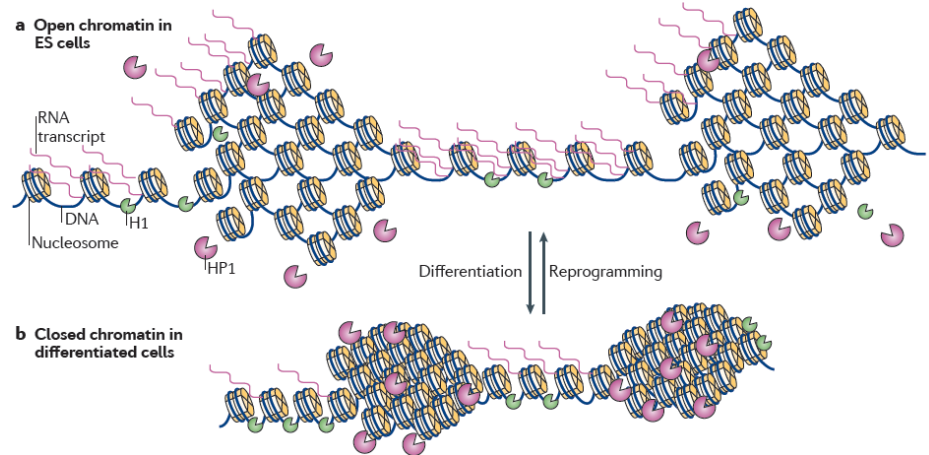
細胞の中は、細胞の状態によって、様々に変化している。



■ 遺伝子発現ネットワーク



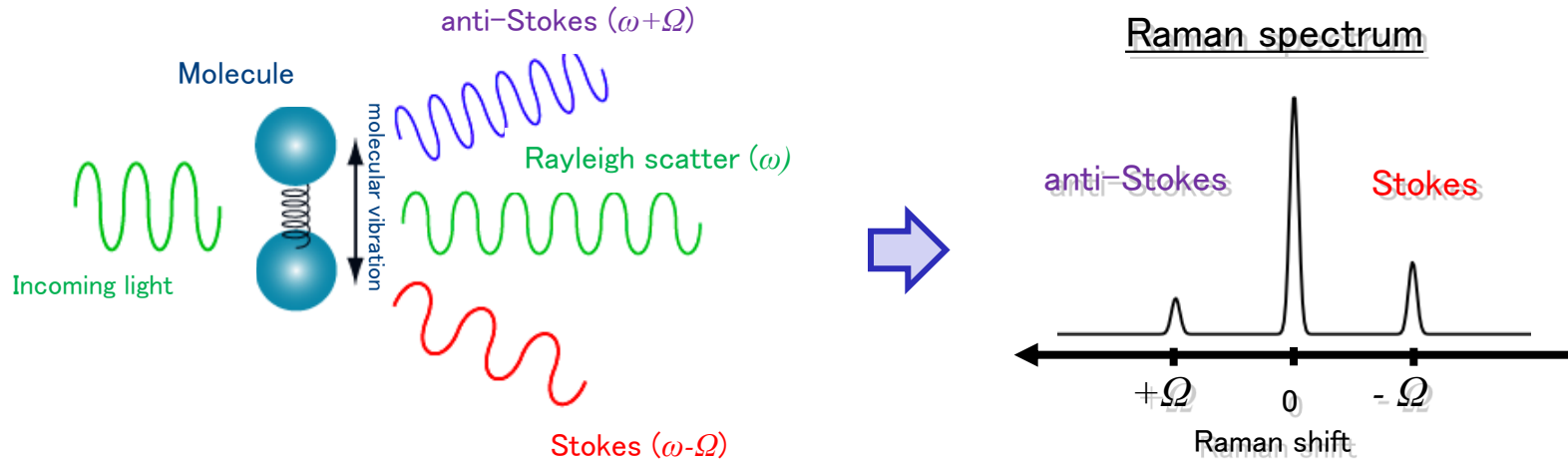
■ クロマチン構造の変化



細胞の中の『状態』変化を捉える技術 ~ラマン分光~

ラマン分光法 は、細胞の状態をスペクトルとして表現できる

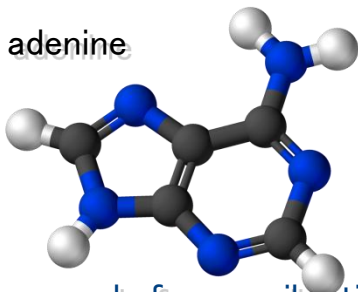
Raman spectroscopy = intrinsic molecular vibration spectroscopy



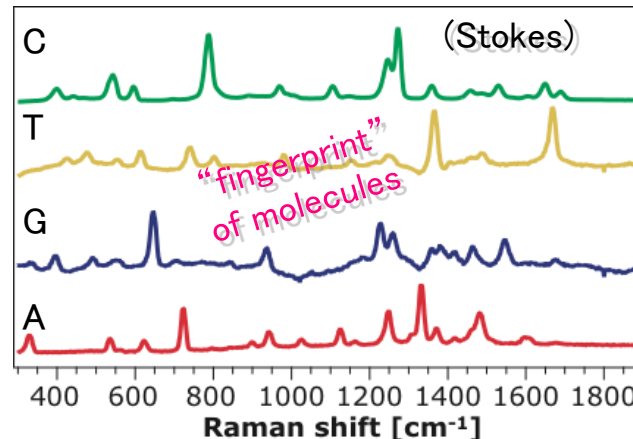
例えば、ラマン分光を用いれば、ヌクレオチドの種類を識別できる。

Polyatomic DNA molecule

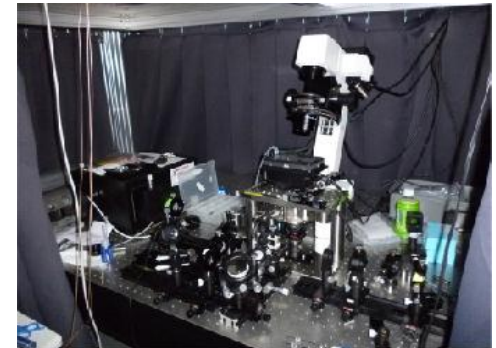
adenine



composed of many vibrational modes.



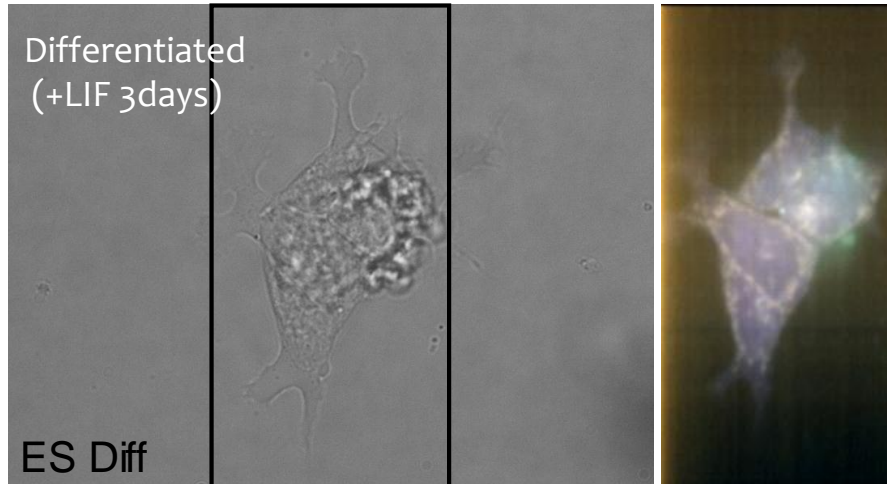
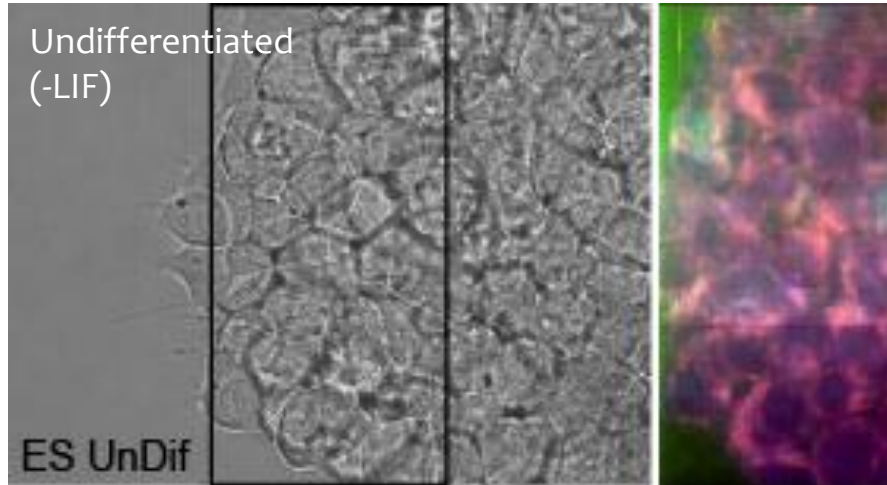
我々のラマン顕微鏡



核の状態を非染色で観察する

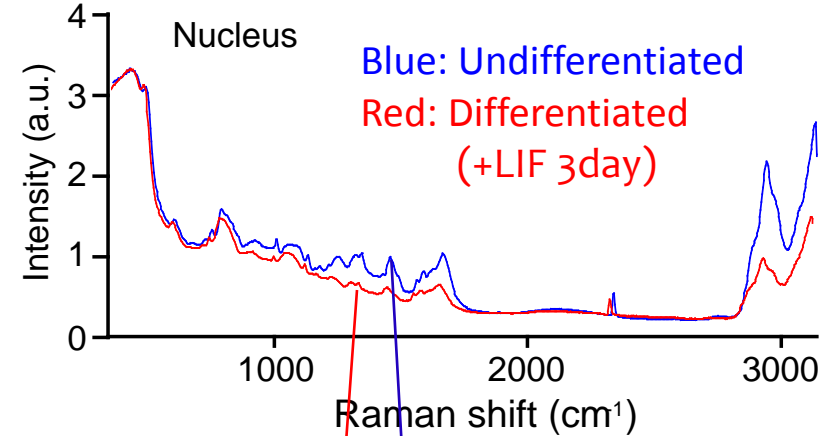
ES細胞が分化すると、細胞内のラマン分光スペクトルが変化する。

■ ラマン分光イメージング

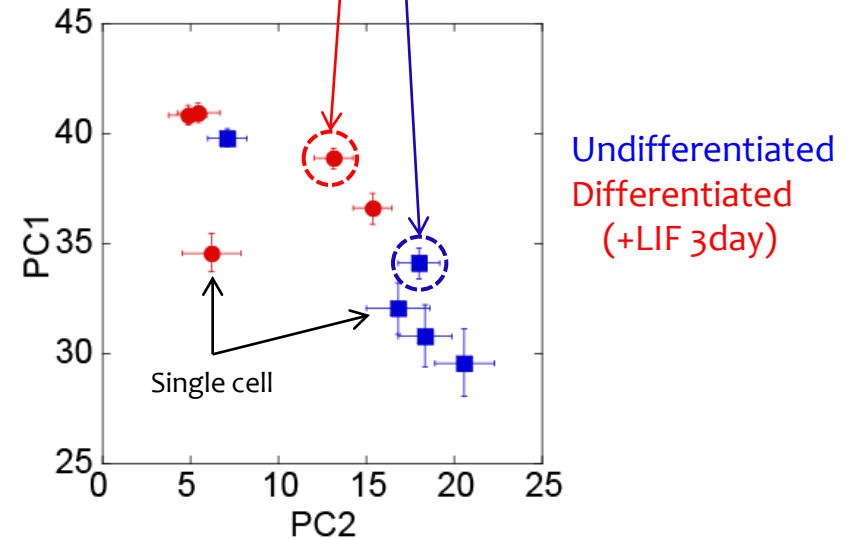


Red: 750 cm^{-1} (Cytochrome C) Blue: 2877 cm^{-1} (Lipid)
Green: 1685 cm^{-1} (Phenyl ring)

■ ラマン分光スペクトル

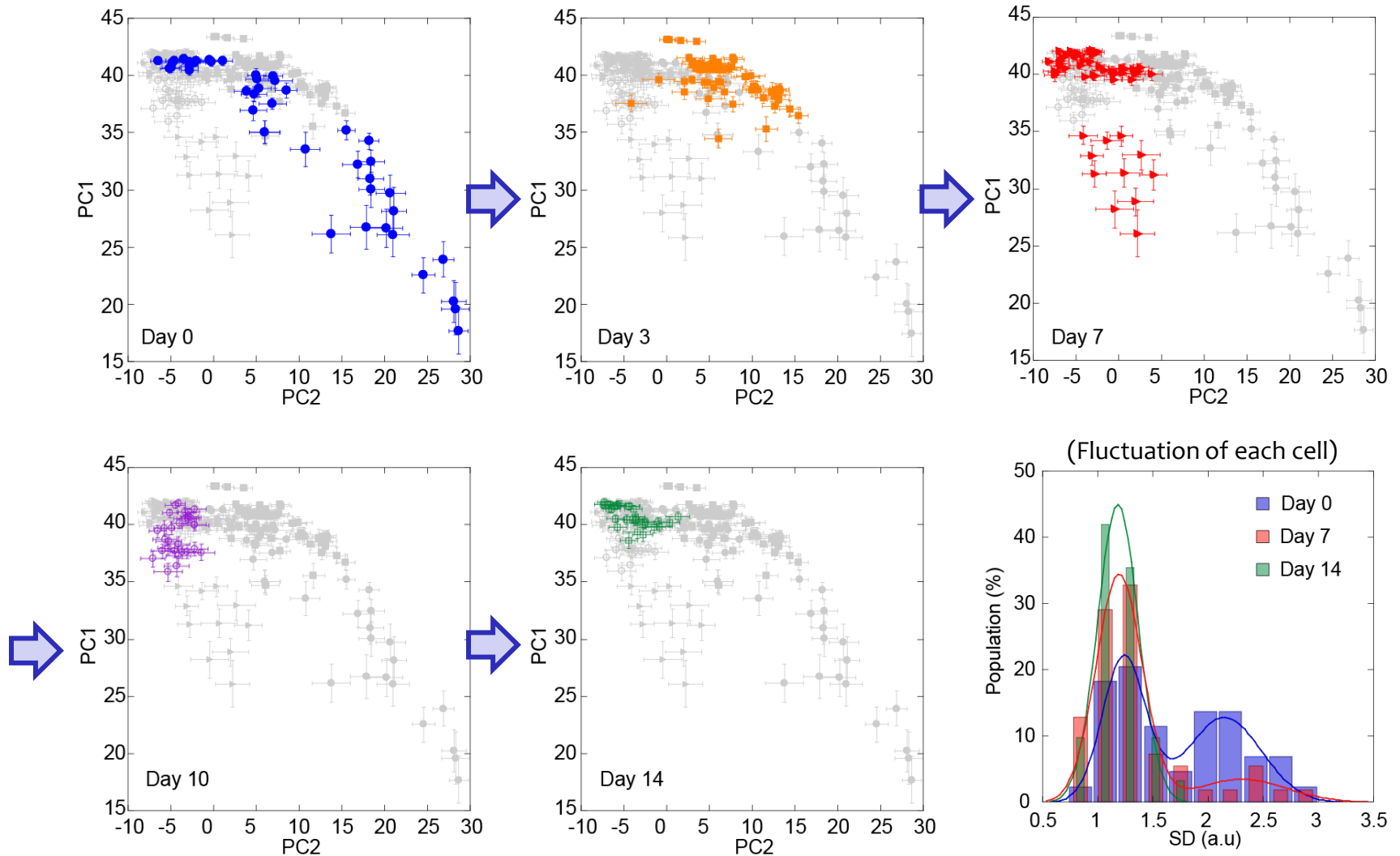


■ 主成分解析によるプロット



核の状態を非染色で追跡する

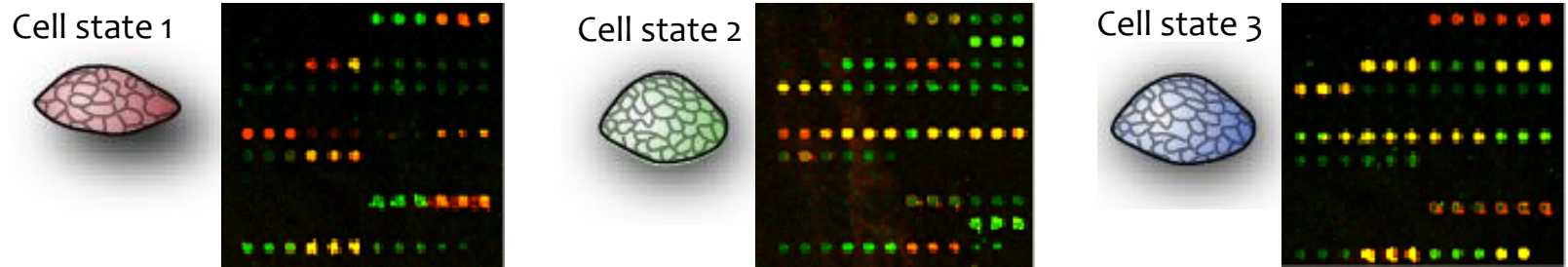
■ ES細胞が分化(LIF除去)する時のラマン分光スペクトルの変化



ラマン分光スペクトルは、細胞の内部状態の変化を反映している信号である。

“細胞指紋”の提案

従来、細胞の状態を定義するためには、遺伝子発現パターンなどの網羅的なデータを用いてきた。



細胞状態を定義することを目的とするなら、網羅的なデータを必ずしも必要としない。

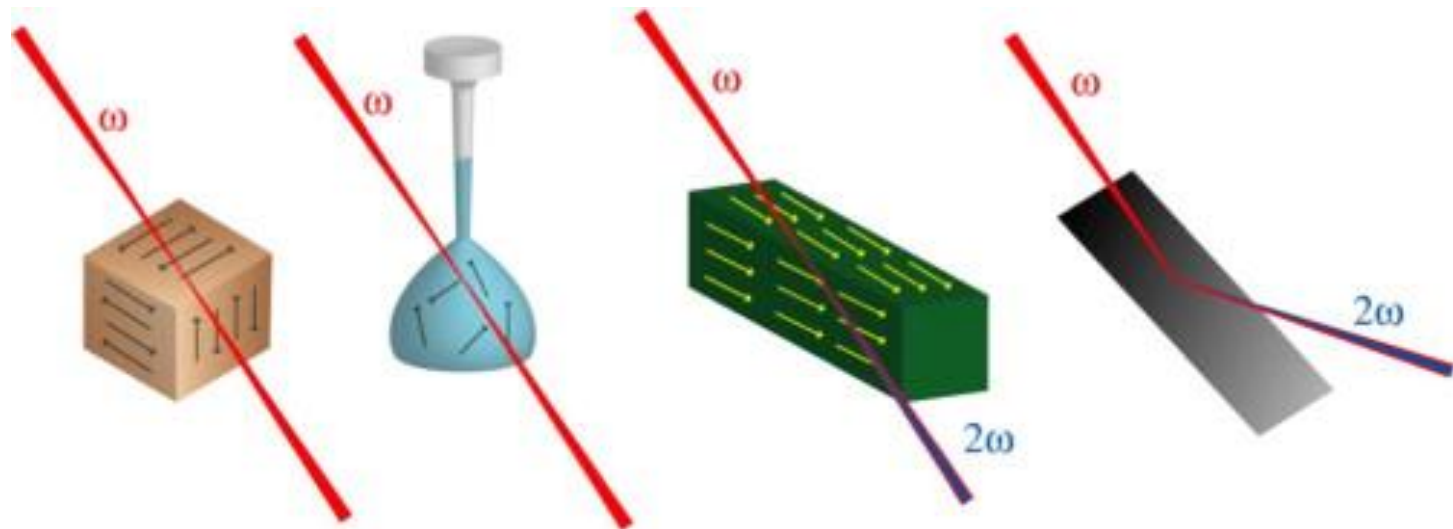


ラマンスペクトルは、細胞の状態によって異なる → **細胞指紋**



分子の分極状態を反映する光 ~第二次高調波~

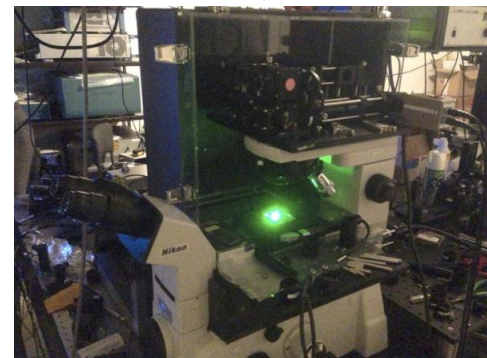
第二次高調波は、元となる材料の構造情報を反映した光である。



van der Veen MA et al. *Microporous and Mesoporous Materials* 166 (2013) 102–108

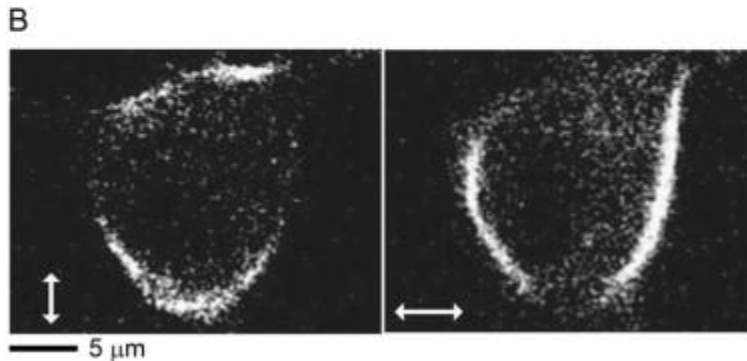
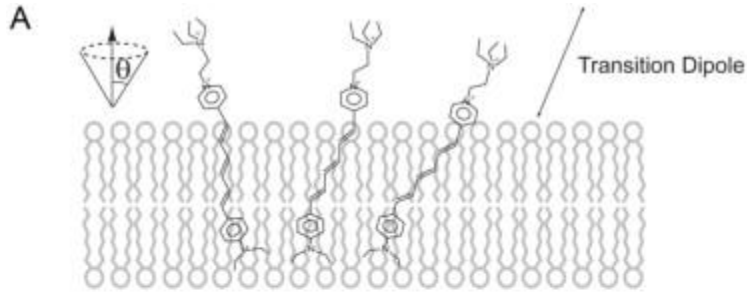
- ・媒質に入射した基本光の2倍の周波数のSHG光が発生
媒質が反転中心を持つときには起こらない。
一般的な固体や液体ではSHGは起こらない。
- ・物質が反転中心を持たない多くの場合にSHG光が発生
その物質は分極を有する。
分極反転させた強誘電体や分極処理された高分子等。

我々のSHG顕微鏡

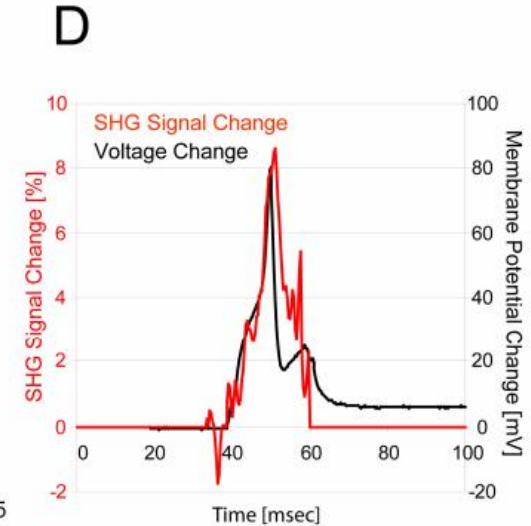
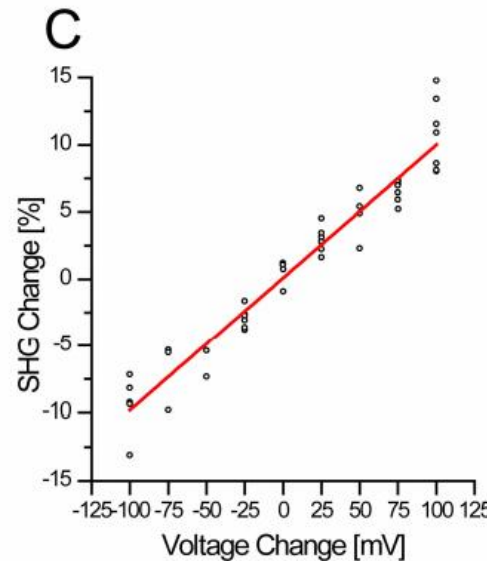
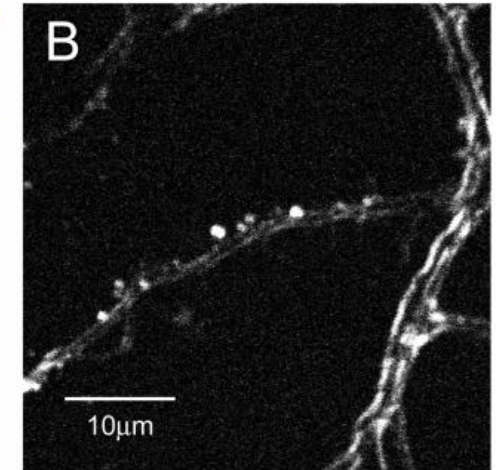
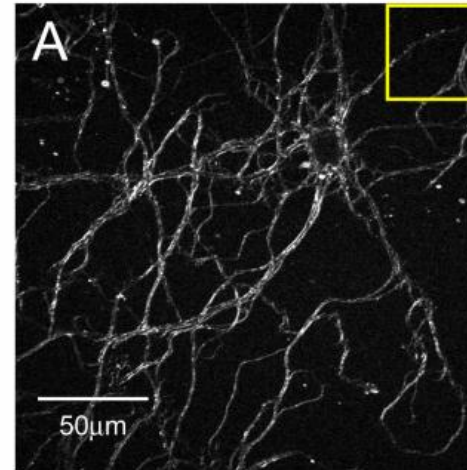


分子の分極状態を反映する光 ~第二次高調波~

細胞膜に分極特性を与えることで、細胞の活動電位が計測できる。

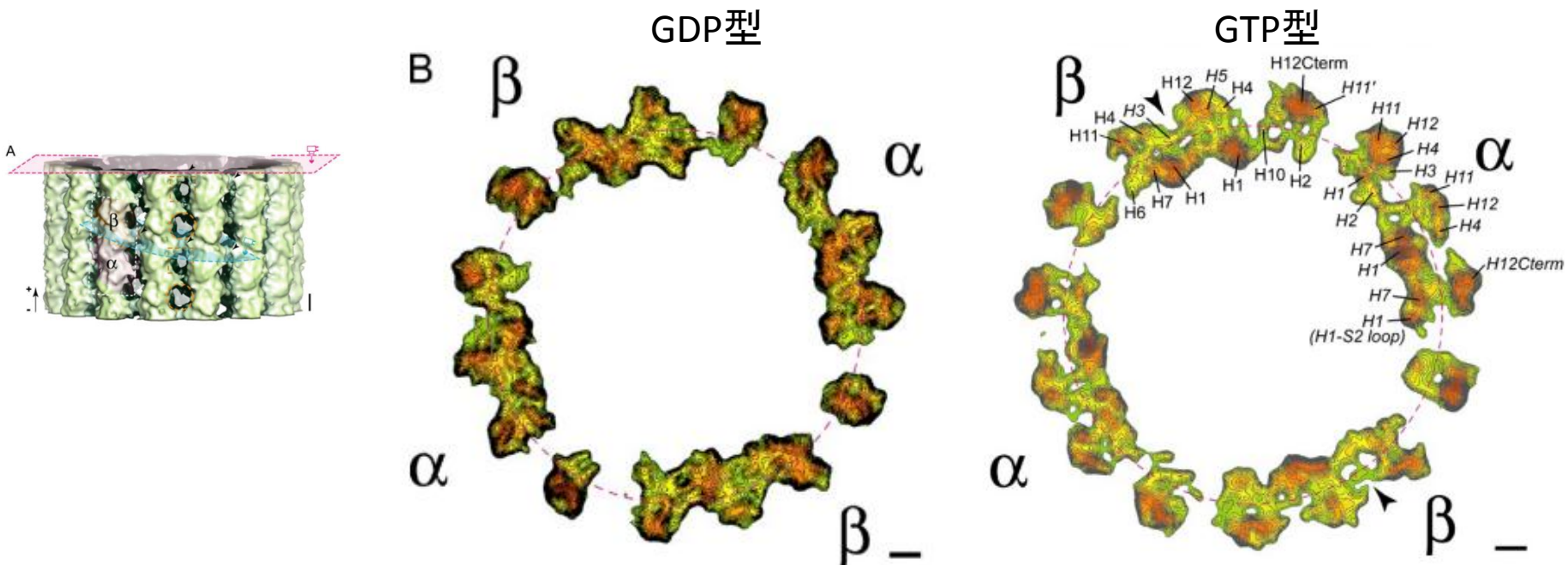
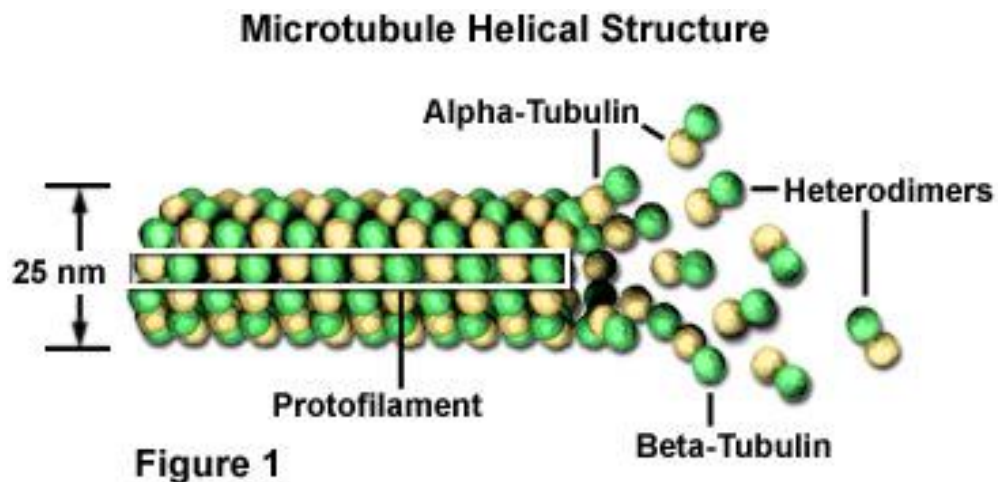
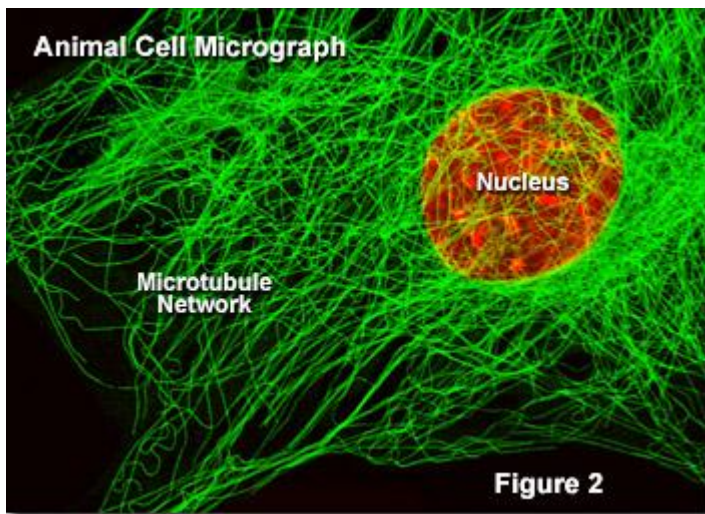


Jiang J, et al, RBiophys J. 2007 93:L26-8



Nuriya, M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103 : 786-790, 2006

微小管の構造の変化をSHG信号で取得する

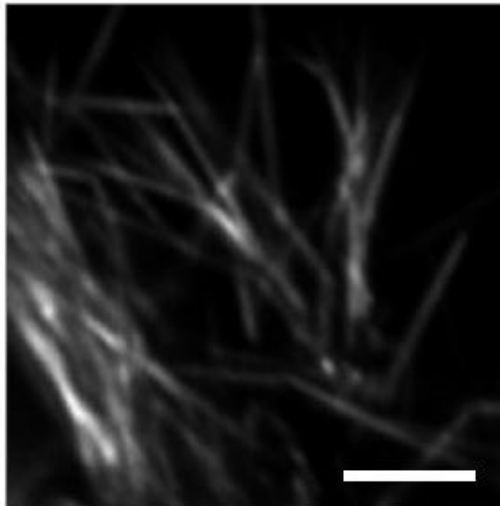


微小管の分極状態をSHG信号で取得する

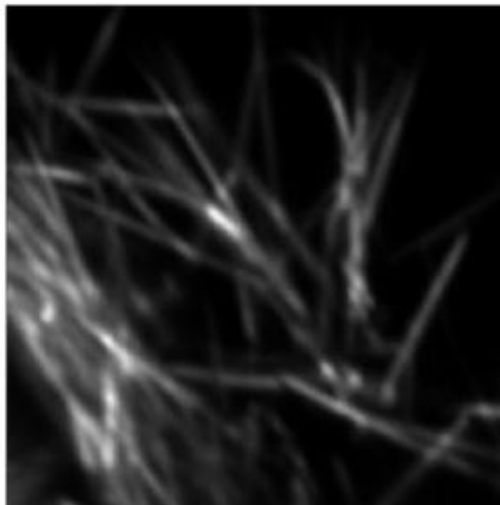
SHG顕微鏡を用いれば、微小管を非染色で観察できる。

Polarization
angle

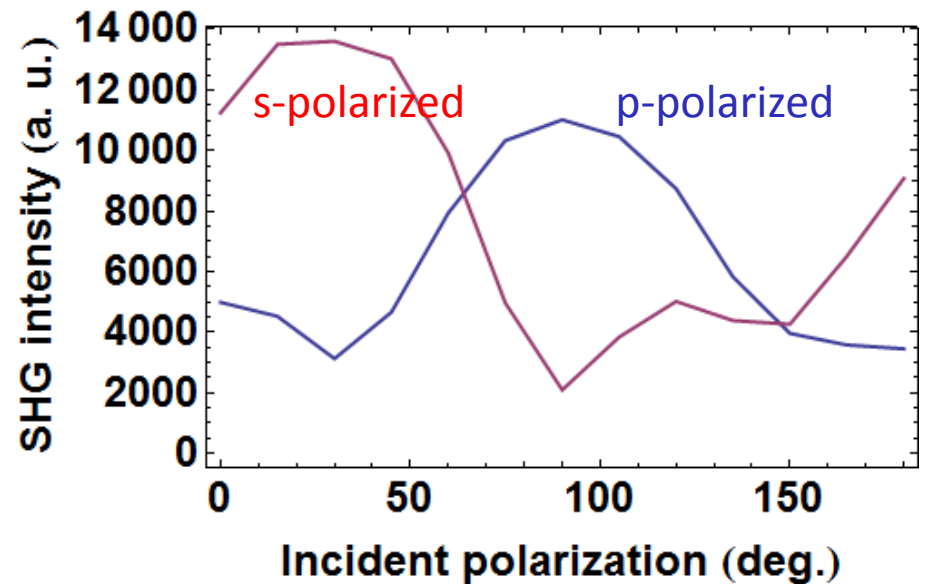
0 deg.



90 deg.



■ 微小管(束)のSHGイメージング、偏光異方性

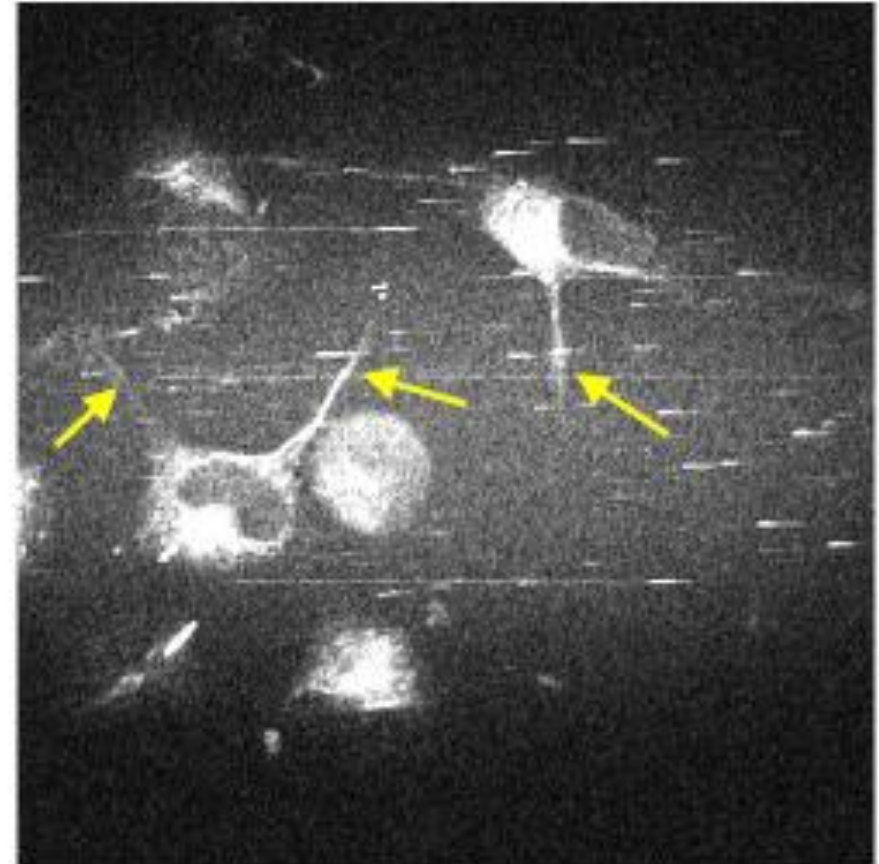
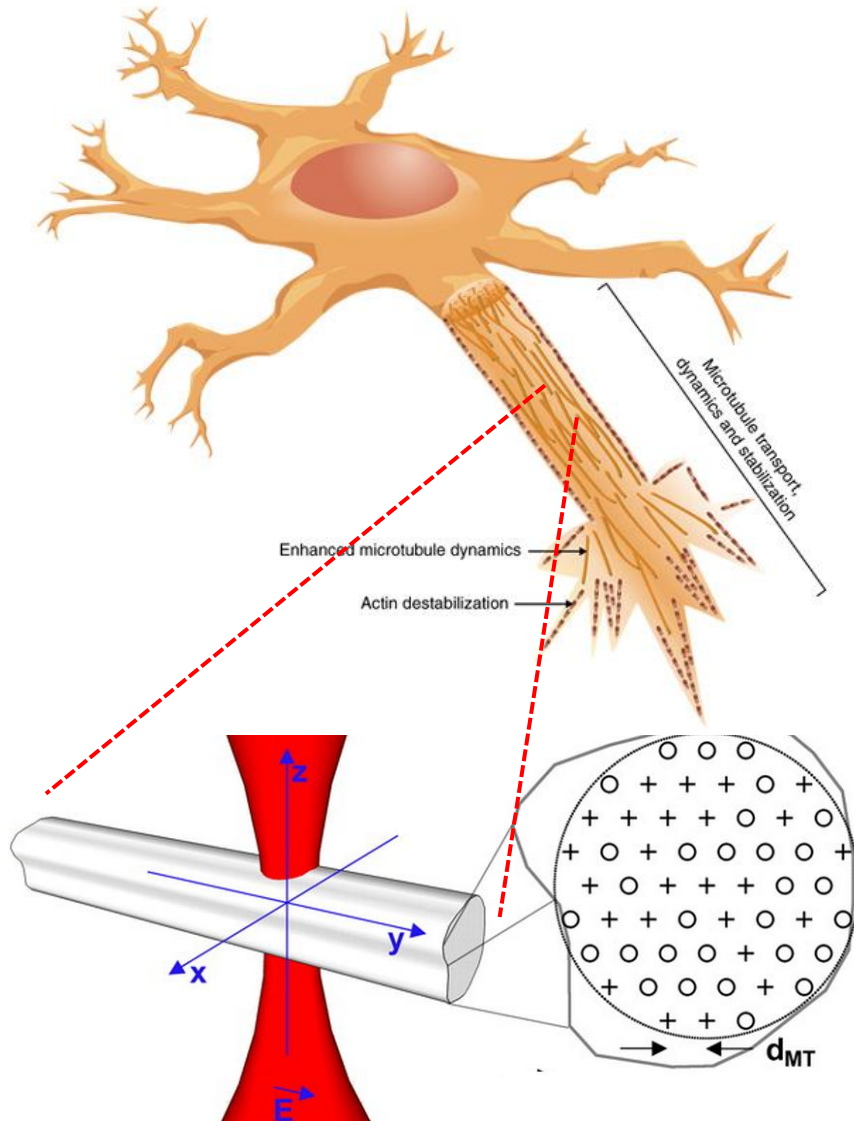


取得されるSHG信号は、
微小管が持つ分極を反映している。

生細胞内での微小管の分極状態をSHG信号で取得する

神経細胞の軸索と樹状突起とで、微小管の状態が異なる。

■ 神経細胞のSHGイメージング像



取得されるSHG信号は、軸索内の微小管の配向を反映している。

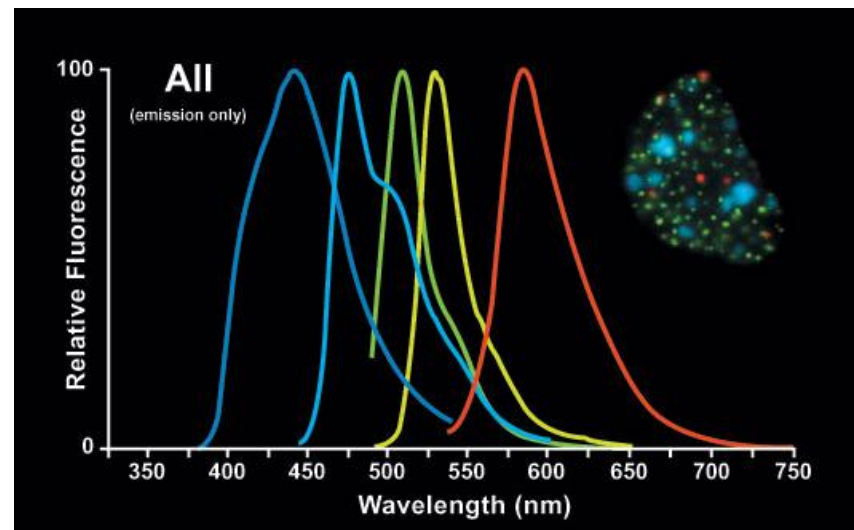
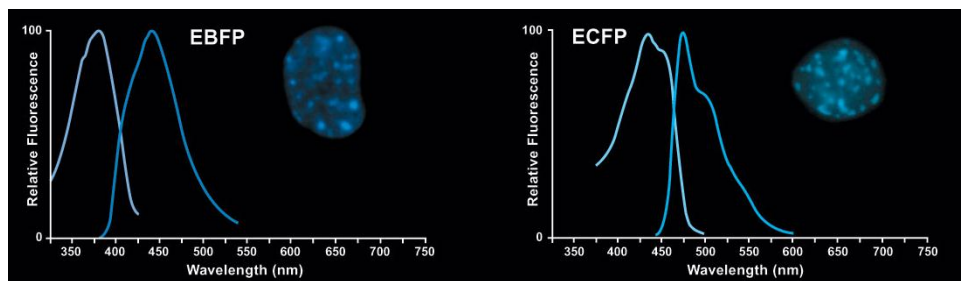
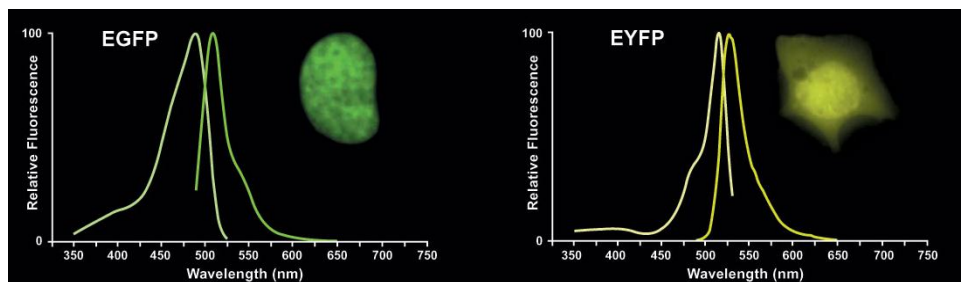
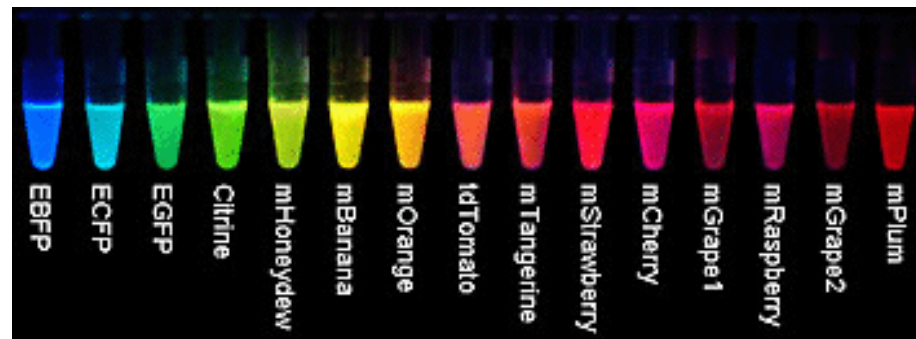
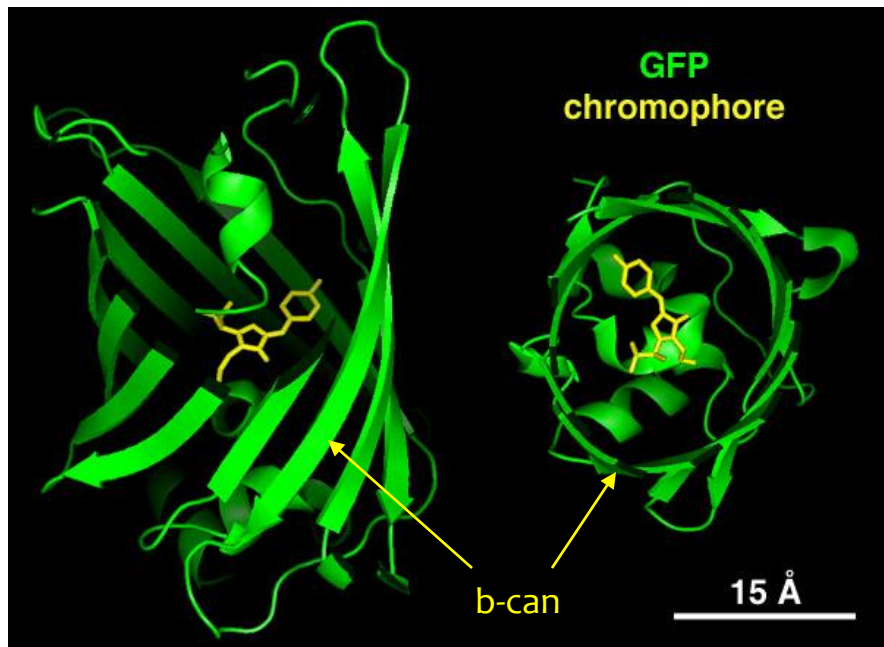
本日のテーマ

光で分解能以下の情報を取得する。

- ① 一点の『位置』であれば、nm精度で計測可能
シリンドリカル光学と偏光光学により、四次元化。
- ② 分子振動や構造を反映した光を用いる
ラマン分光により、細胞内部の状態変化を計測。
SHGにより、蛋白質の分極状態を計測。

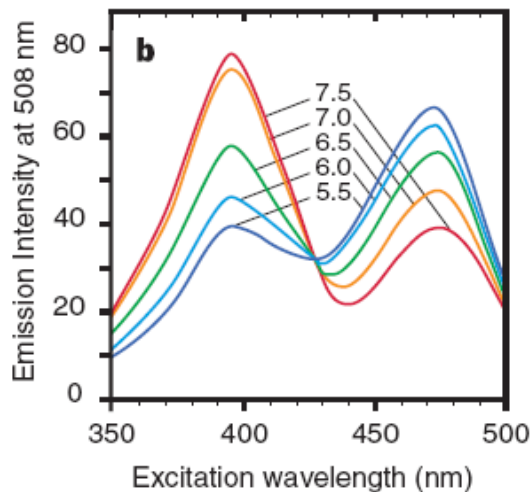
状態を蛍光に反映させる技術 ~蛍光蛋白質~

遺伝子でコードされた光る蛋白質



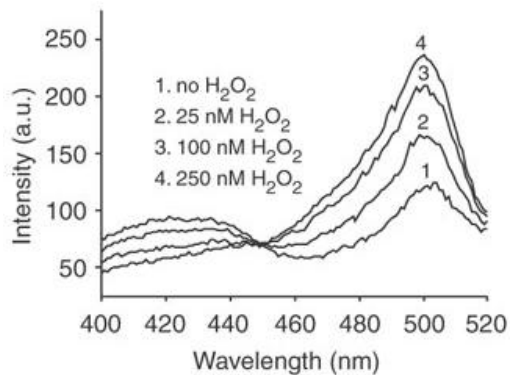
様々な環境感受性蛍光蛋白質

■ pH sensor (SynaptopHluorin)



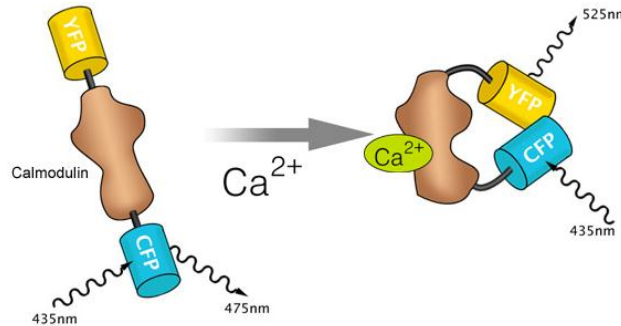
Miesenbock G, et al., Nature 394: 192–195, 1998.

■ H₂O₂ sensor (HyPer)



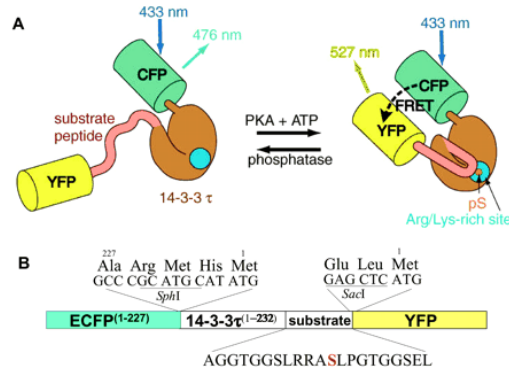
Belousov VV, et al., Nat Methods 3: 281–286, 2006

■ Ca²⁺ conc. (Cameleon)



Nagai T, et al., PNAS 101: 10554–10559, 2004.

■ PKA activity (AKAR1)

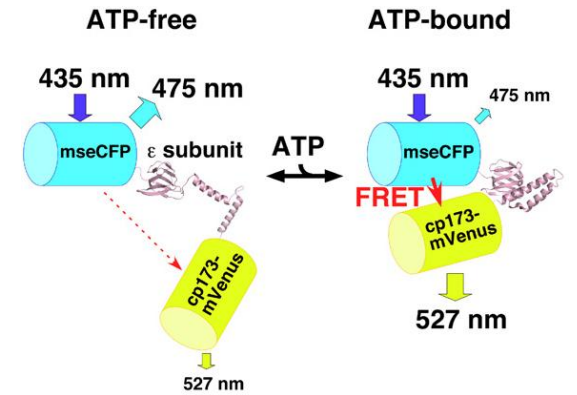


Zhang J, et al., PNAS 98: 14997–15002, 2001.

■ Other

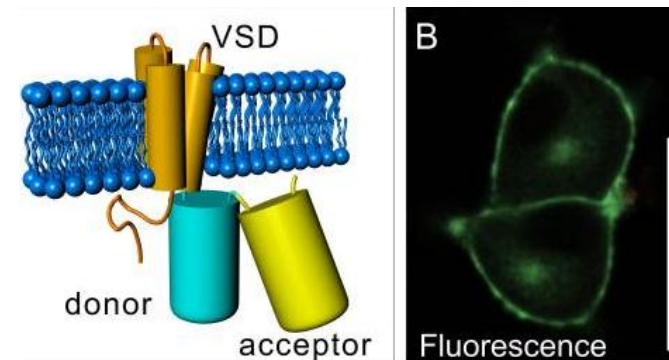
Redox potential (roGFP1)
Caspase-3 activity (Casper3)

■ ATP conc. (A-Team)



Imamura H, et al., PNAS 106: 15651–15656, 2009.

■ Membrane Potential VSFP2.4)



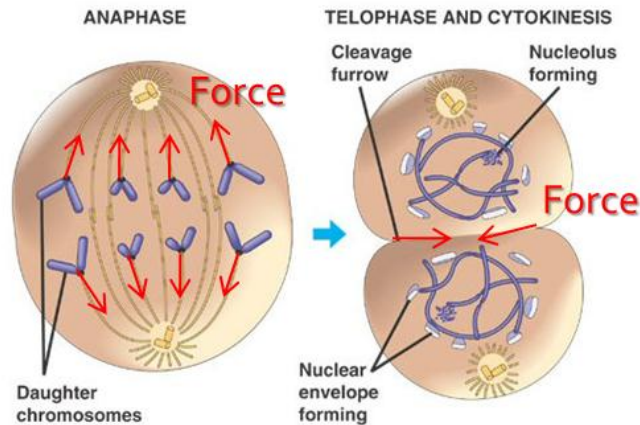
Mutoh H, et al., PLoS ONE 4: e4555, 2009.

Dooley CT, et al., J Biol Chem 279: 22284–22293, 2004.
Shcherbo D, et al., BMC Biotechnol 9: 24, 2009.

我々の挑戦 『力学応答⇔化学反応』変換の光検出

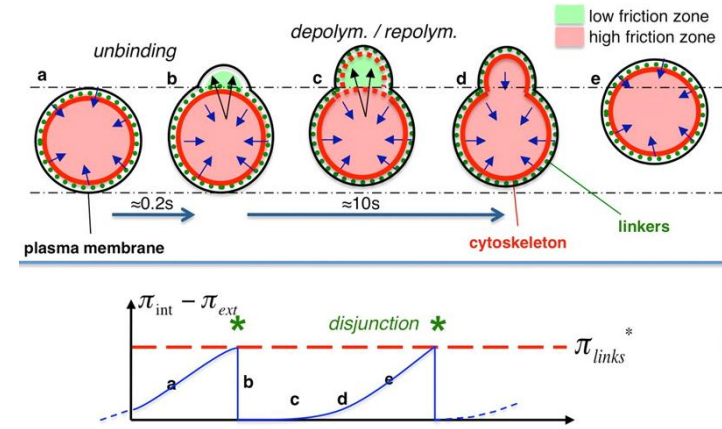
力学パラメータを色の変化として検出する

■蛋白質が発する力



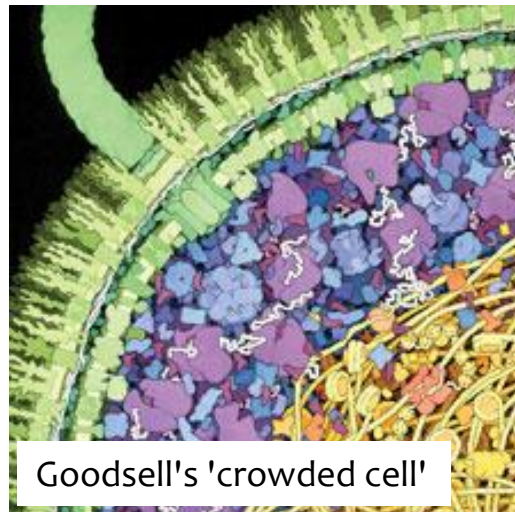
Ichimura T, et al., Chem comm, 2012

■細胞内圧力

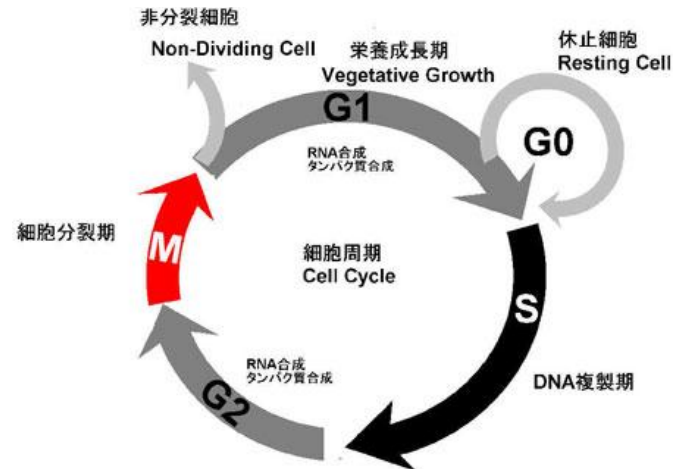


Watanabe T, et al., submitted.

■蛋白質濃度

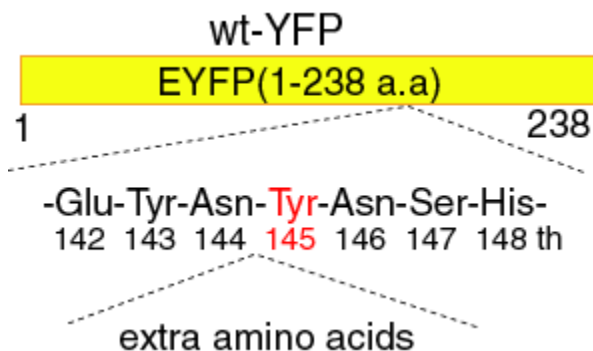


■細胞周期



蛋白濃度感受性蛍光蛋白質の開発

YFPの144、145番目の間にグリシンを挿入して、Y145の向きを変える。



β -can構造を少し歪ませたうえに、Y145のフェノール環の位置を変える。

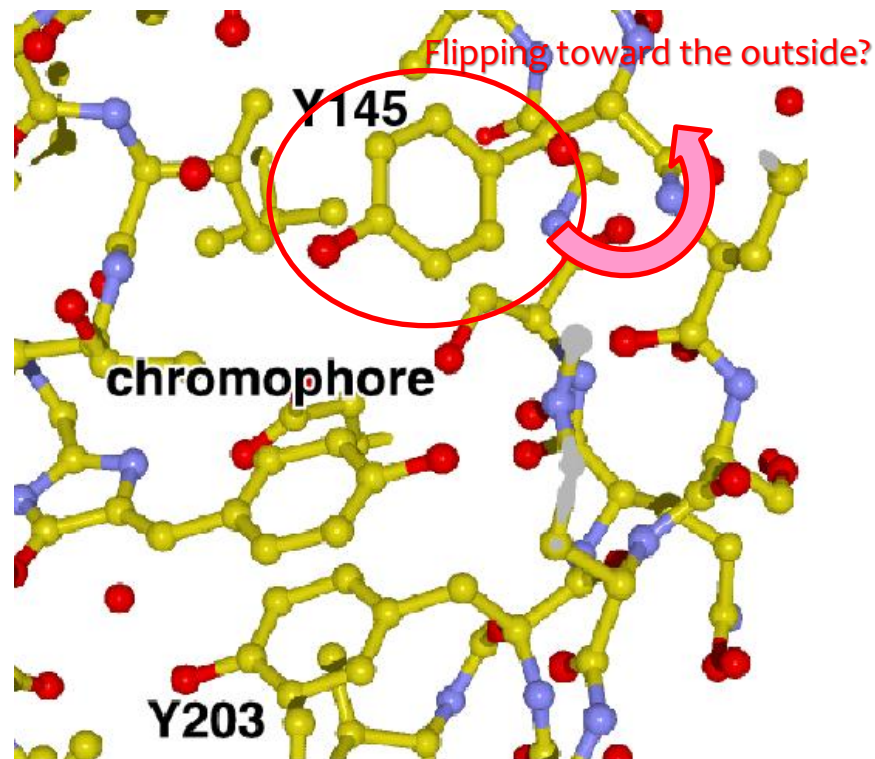


発光団付近に水分子が配置される。



水分子の状態に敏感な蛍光蛋白質。

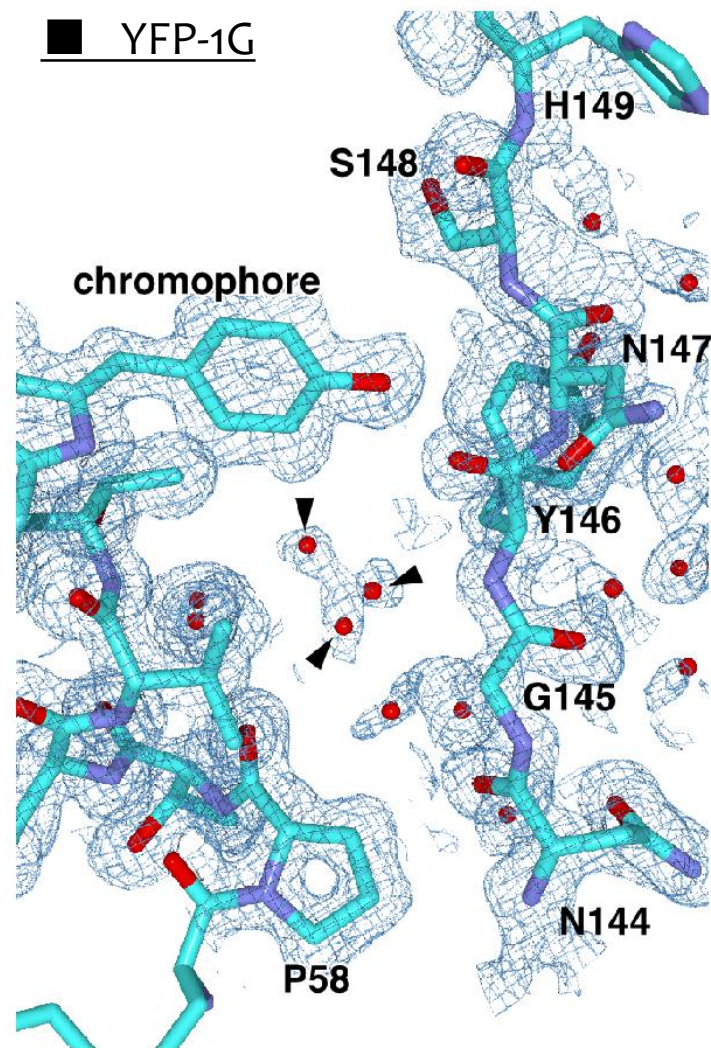
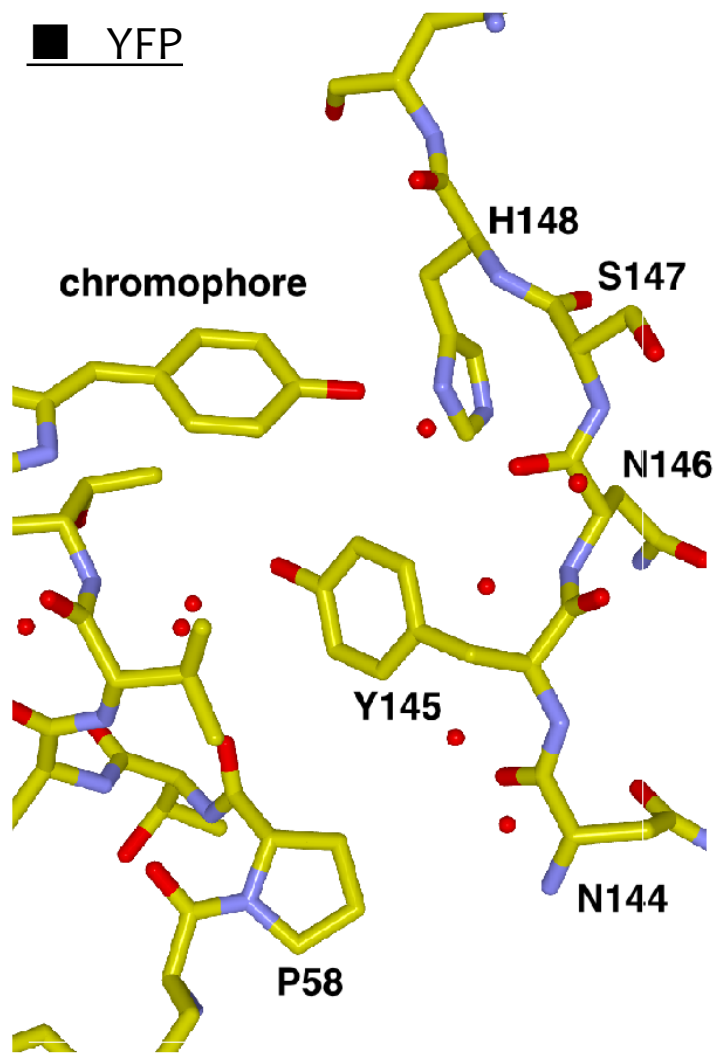
■ 発光団付近の構造



挿入したアミノ酸の種類、個数を、様々に試行して、グリシンを選択した。
今回は、グリシンを挿入した場合のみです。

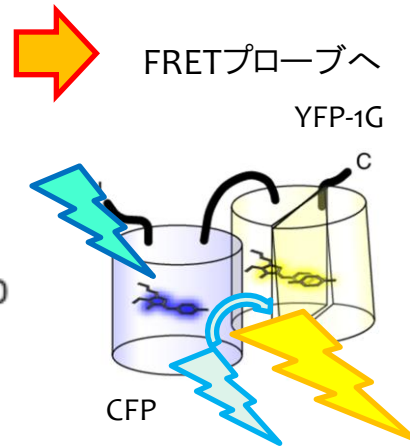
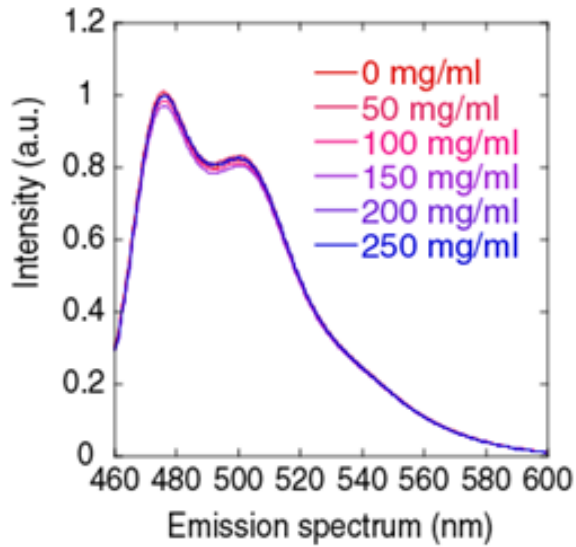
蛋白濃度感受性蛍光蛋白質の開発

予想通り、発光団付近に水分子が配置されていた。

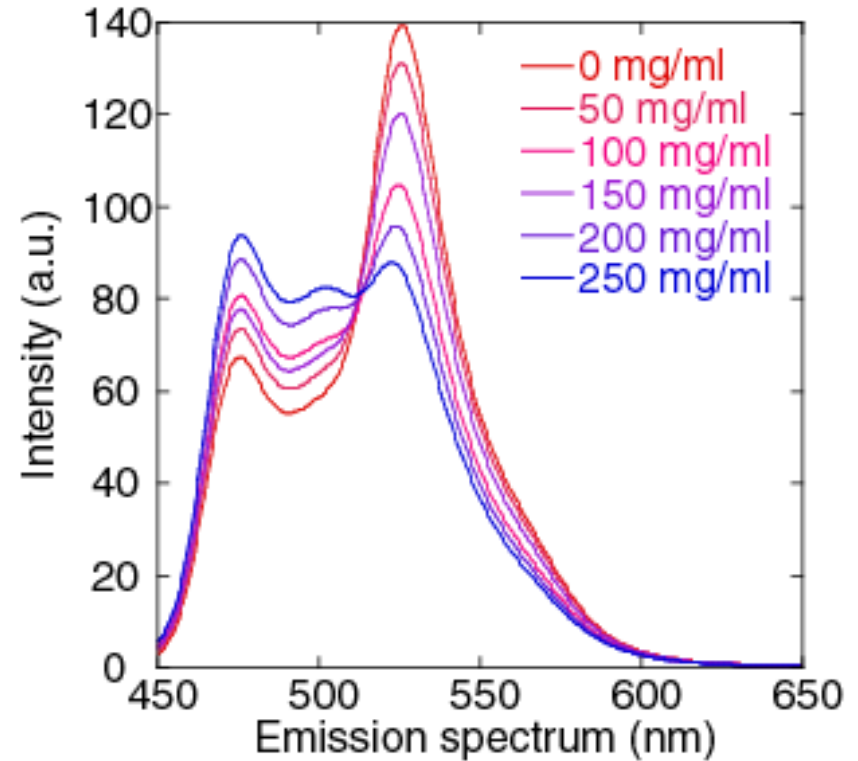


蛋白濃度感受性蛍光蛋白質の開発

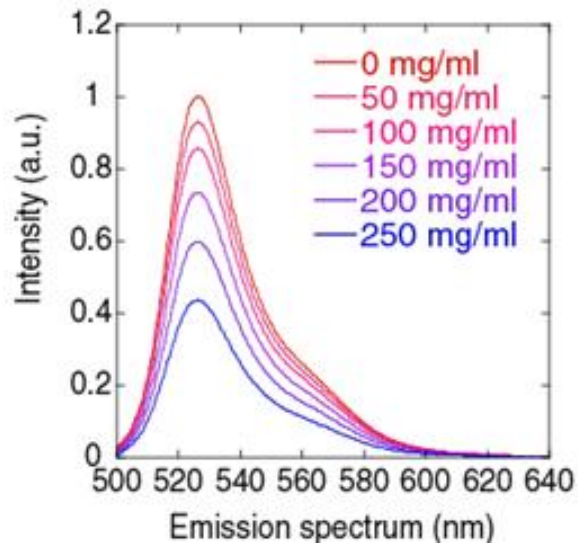
■ CFP



■ CFP-YFP-1G



■ YFP-1G



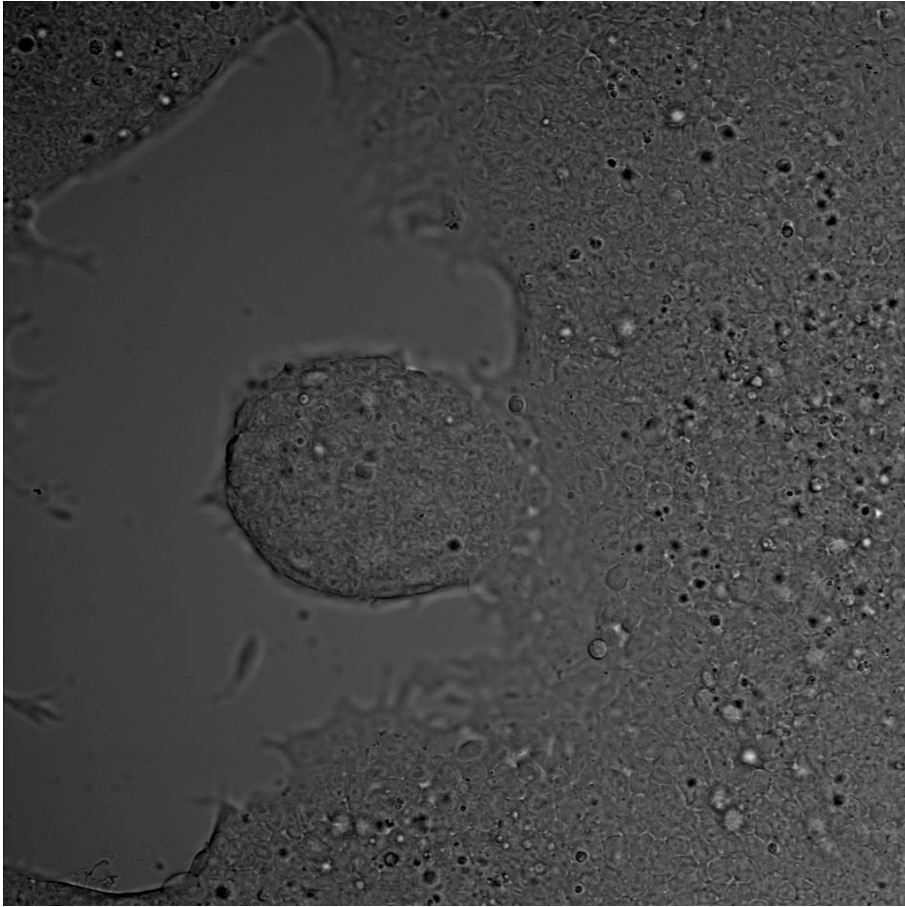
BSA濃度により波長特性が変わる蛍光蛋白質の完成。



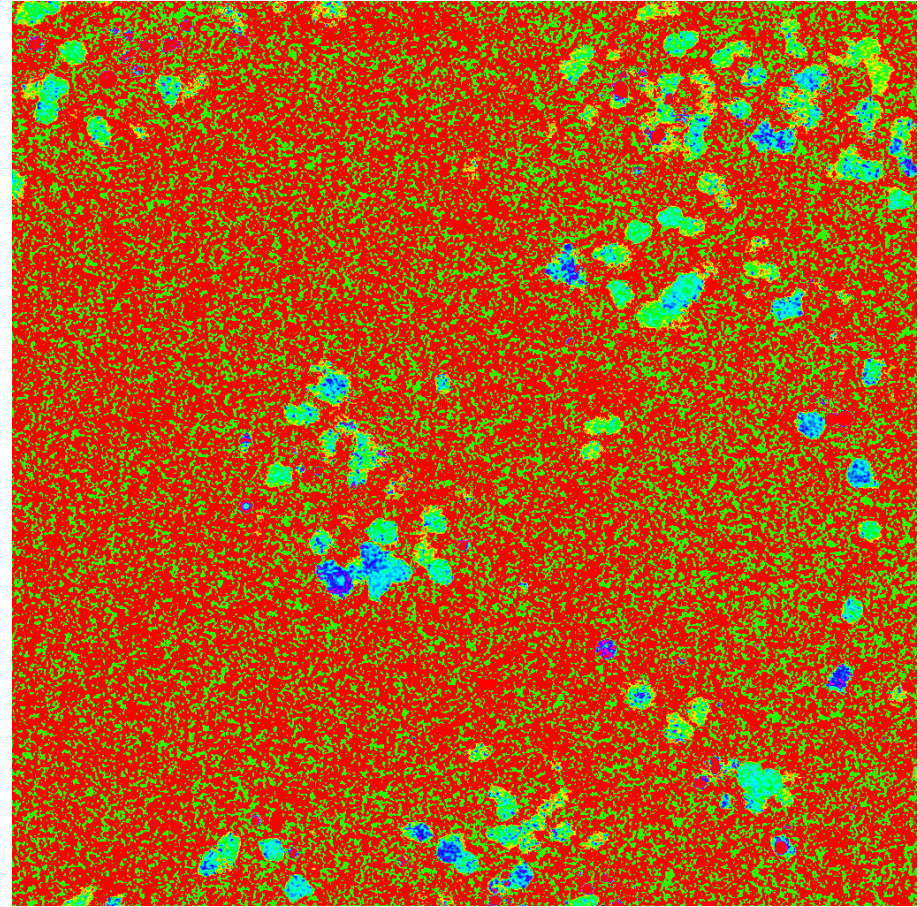
細胞分裂中の細胞内蛋白質濃度を観てみよう。

細胞分裂中における細胞内蛋白質濃度変化の計測

■ 明視野像



■ Ratiometricイメージ (YFP/CFP)



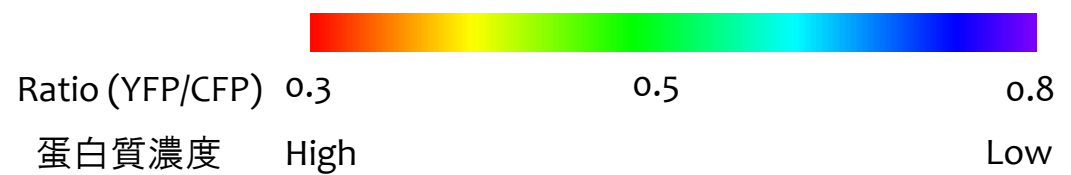
ES細胞のコロニー(Embryonic body)

基盤: ガラス

励起: 880 nm

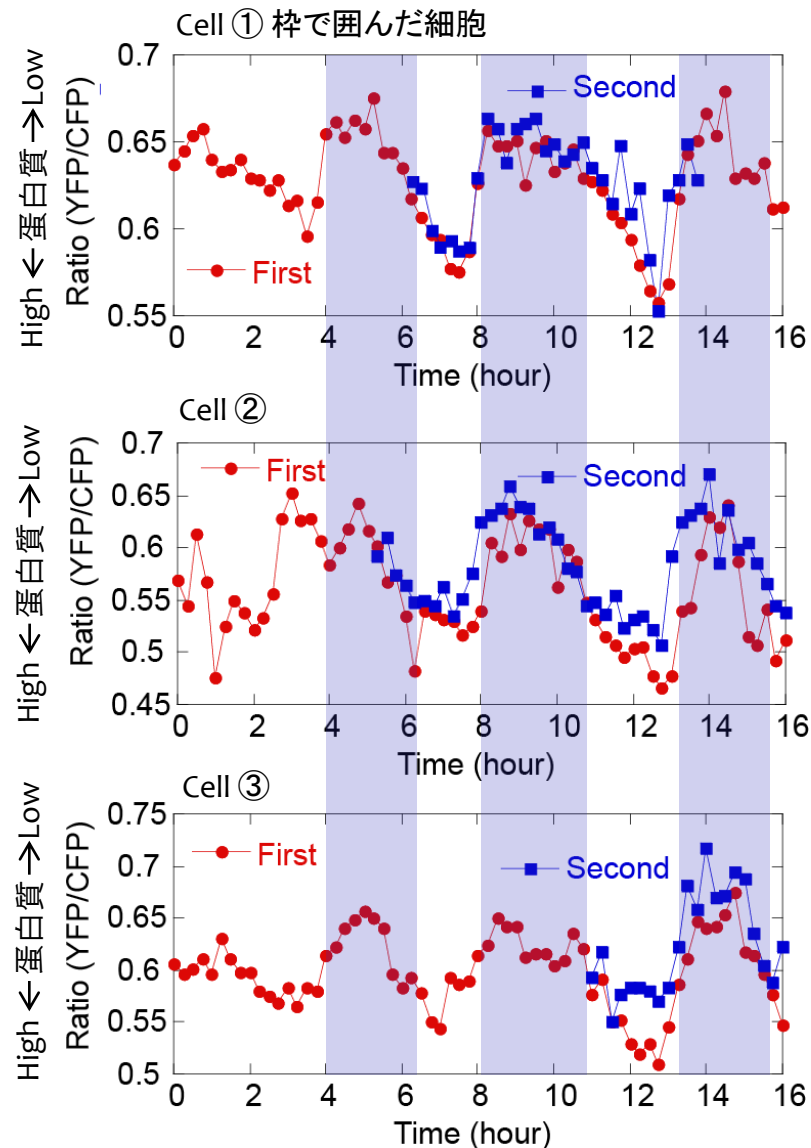
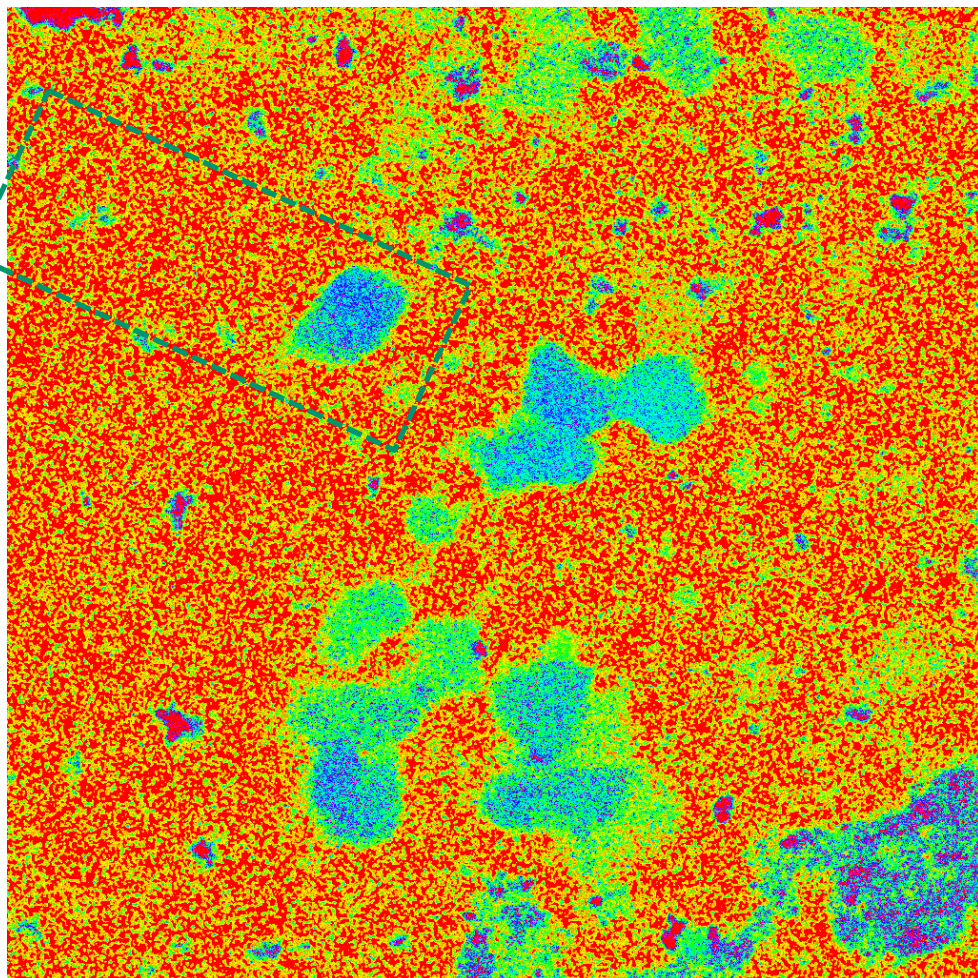
フレームレート: 15分 / 画像

*) 18時間を2秒で再生



細胞分裂中における細胞内蛋白質濃度変化の計測

■ Ratiometricイメージ (YFP/CFP) 拡大 *) 18時間を6秒で再生



蛋白質濃度は、細胞間で同期しており、蛋白質濃度が上がる直前で分裂する??

本日のテーマ

光で分解能以下の情報を取得する。

- ① 一点の『位置』であれば、nm精度で計測可能
シリンドリカル光学と偏光光学により、四次元化。
- ② 分子振動や構造を反映した光を用いる
ラマン分光により、細胞内部の状態変化を計測。
SHGにより、蛋白質の分極状態を計測。
- ③ 蛍光蛋白質に環境感受性を持たせる
水と発光団の相互作用を変化させることで、蛋白質濃度
に感受する蛍光蛋白質ができた。
張力感受性、圧力感受性蛍光蛋白質は完成済み。

光イメージングの最大の利点は、“リアルタイム”である。

ACKNOWLEDGEMENTS

Supervisor

Toshio Yanagida, Osaka University

Quantum dots/rods

Takashi Jin, RIKEN, QBiC

Fumihiko Fujii, Osaka University

Crystal structure

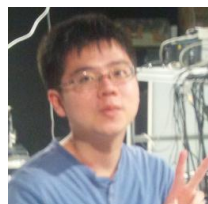
Katsumi Imada, Osaka Univ.

Miki Kinoshita, Osaka Univ.

Raman microscopy

Katsumasa Fujita, Osaka University

Liang-da Chiu, Osaka University



Takamitsu Morikawa
D1
Fluorescent proteins



Taro Ichimura
Research fellow
Spectroscopist



Junichi Kaneshiro
Postdoctoral fellow
Non-linear microscopist

Comprehensive bioimaging team, REKEN, QBiC

