

# 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



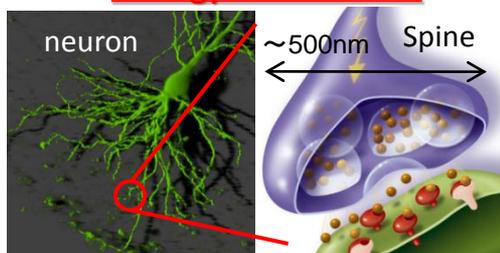
NIR optics



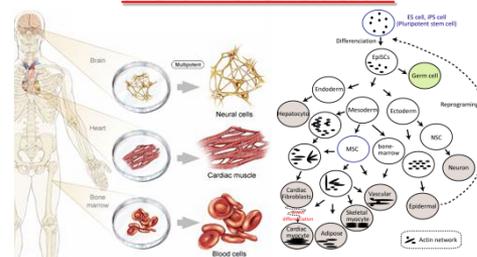
MR technology



Biology in nanoscale



iPS differentiation



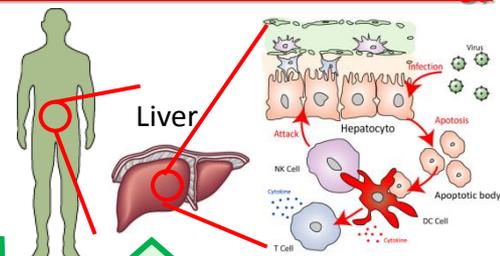
In vivo single molecule



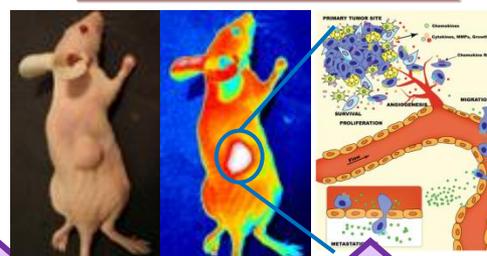
Microfabrication



Cell-cell interaction in Immunology



Cancer metastasis in vivo



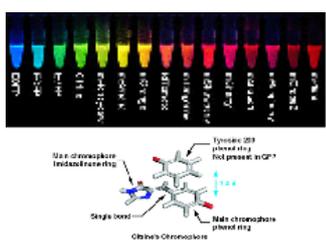
Single molecule



ES/iPS cells



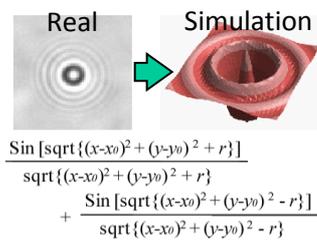
Fluorescent Proteins



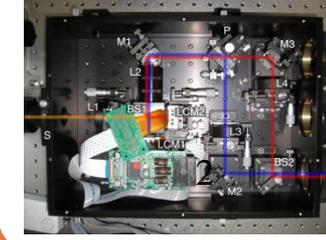
Quantitative analysis



Numeric analysis



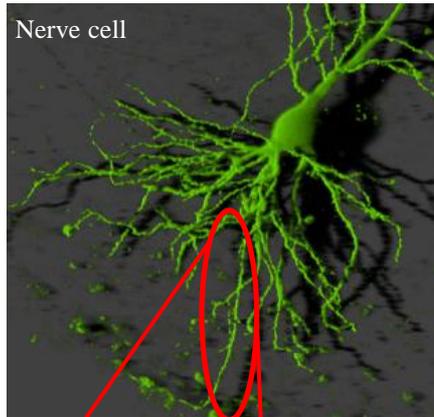
Optical system



# 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 $\mu\text{m}$ 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、 $\sim 1$ 万個。



このスケールになると、濃度の概念  
が通じない。



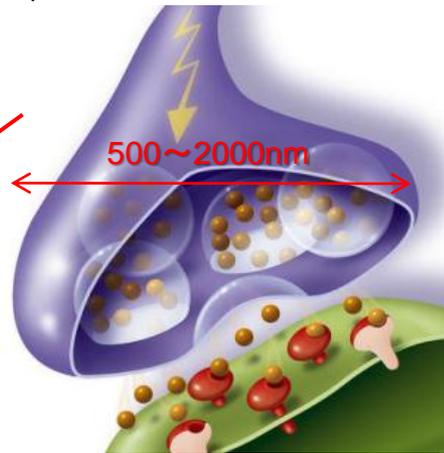
一つ一つを測らなければならない。

Dendrite

Spine

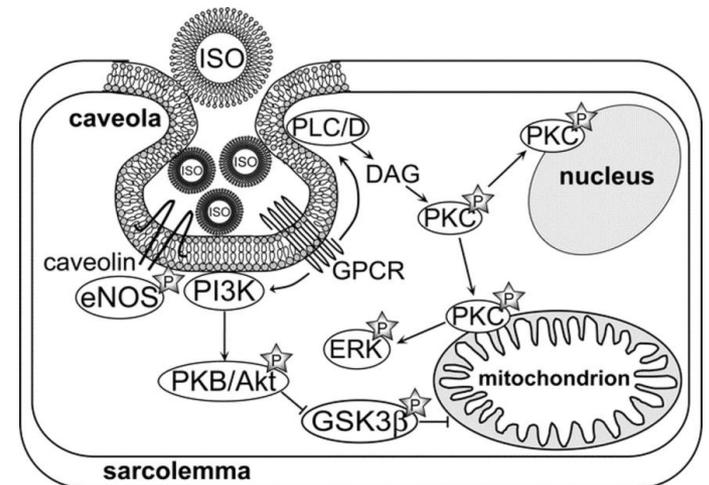
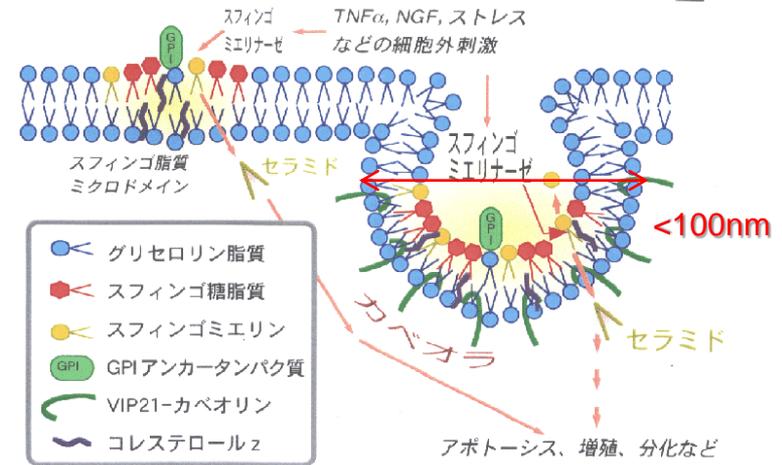


10  $\mu\text{m}$



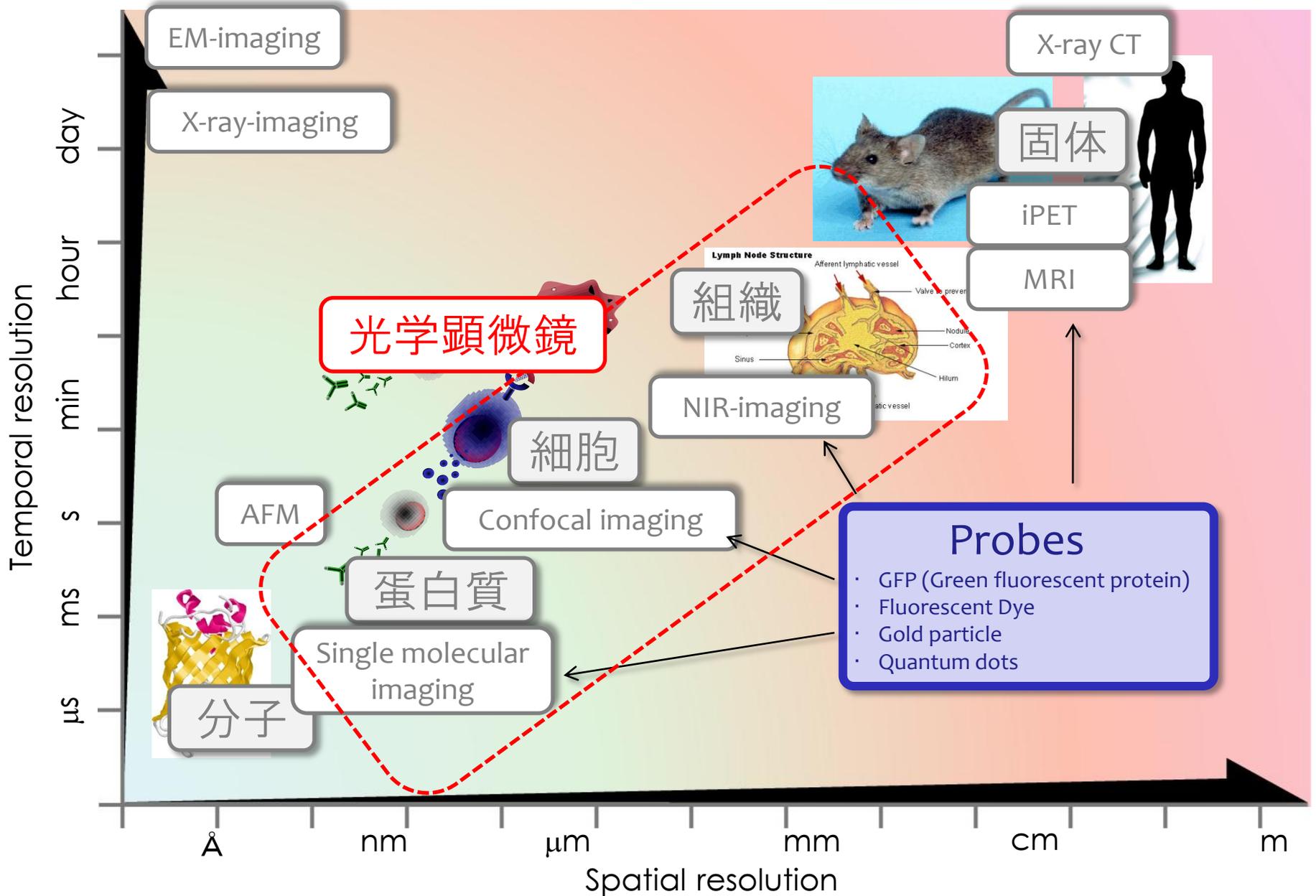
500~2000nm

## 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

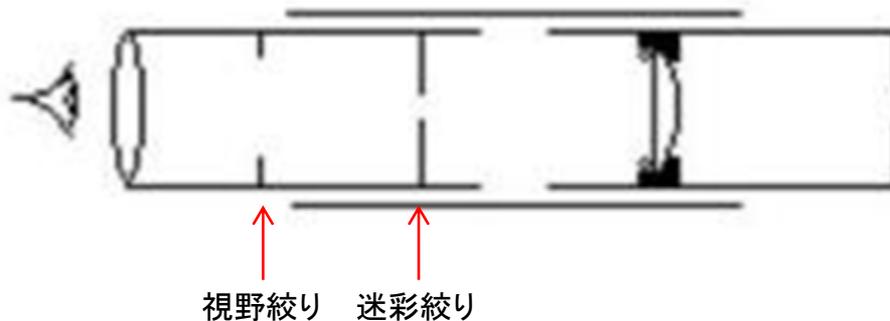


# 光学顕微鏡

■ ヤンセン製の顕微鏡(1595年)



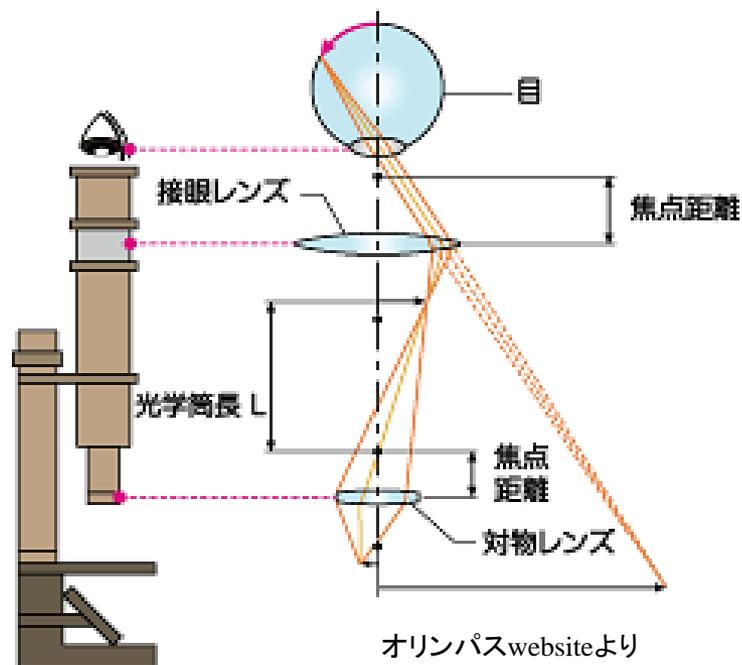
■ ヤンセン製の顕微鏡の仕組み



■ ツァハリアス・ヤンセン(1588-1632)



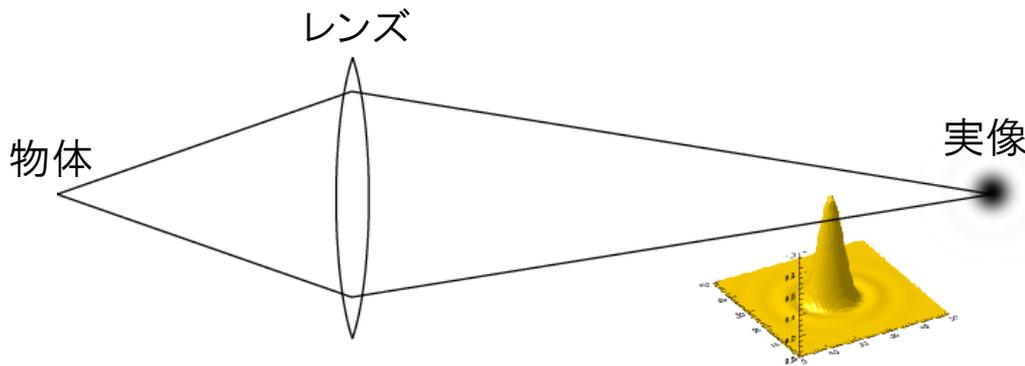
■ 現代の顕微鏡の仕組み



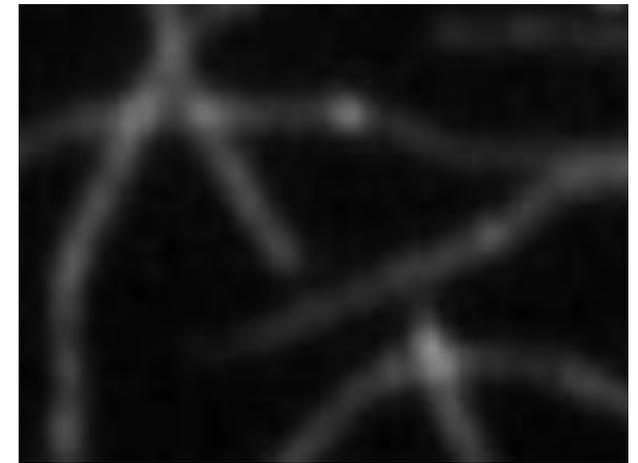
# 光学顕微鏡における分解能

## 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。

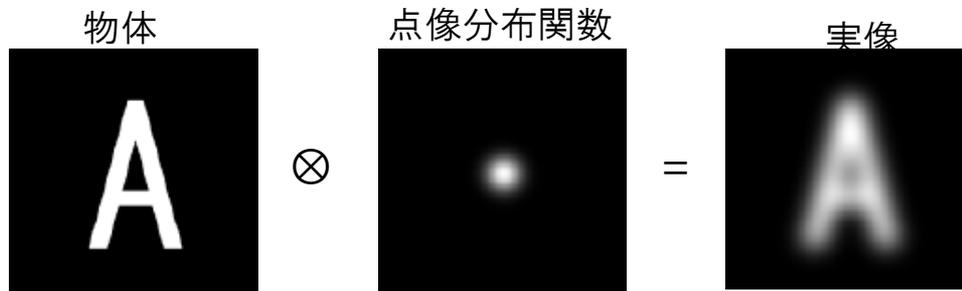


■ アクチンフィラメントの蛍光像



1 μm

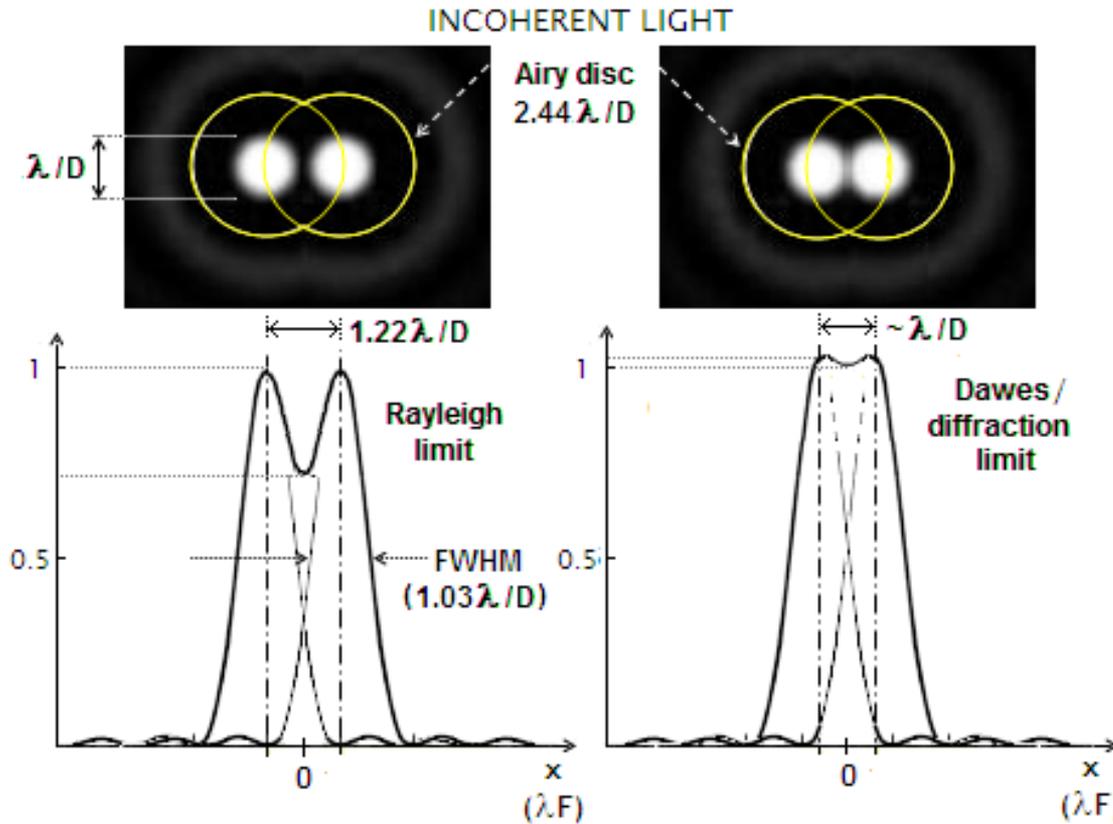
太さ10nm程度のアクチンフィラメントでも、300nm程度にまで滲んでしまう。



# 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

$$= 224 \text{ nm}$$

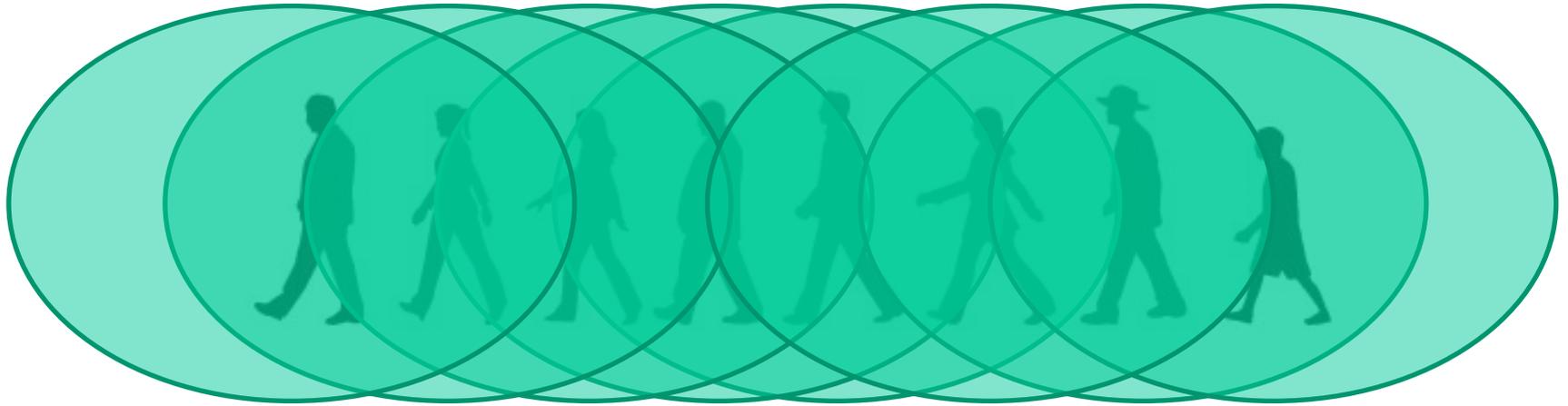
( $\lambda=533, NA=1.45$ )

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

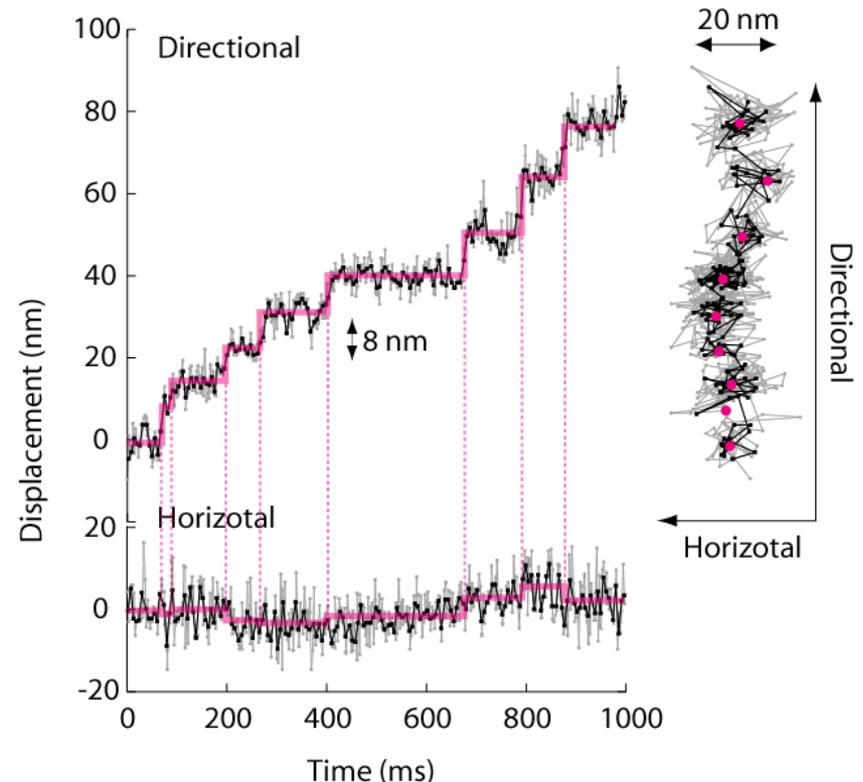
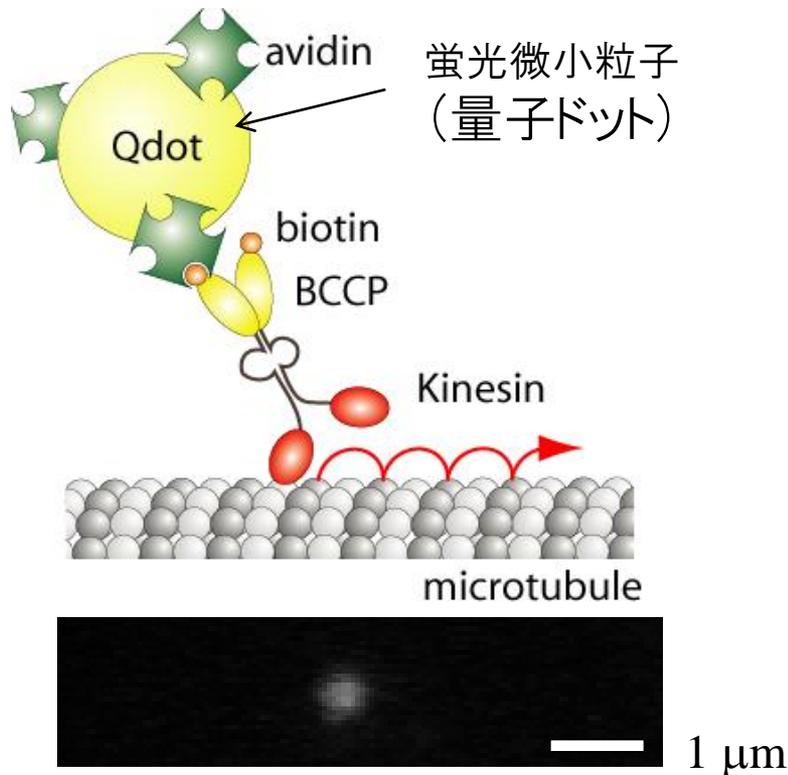
近接する2点を“同時”に区別することは不可能



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。



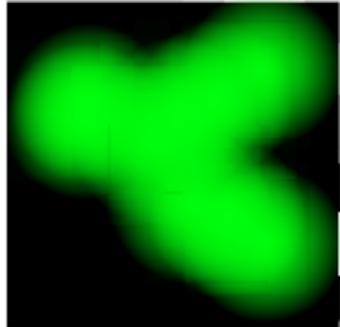
# 単粒子ナノ計測法を用いて回折限界を破る

一画面に数個しか蛍光色素が光らない状態を作る

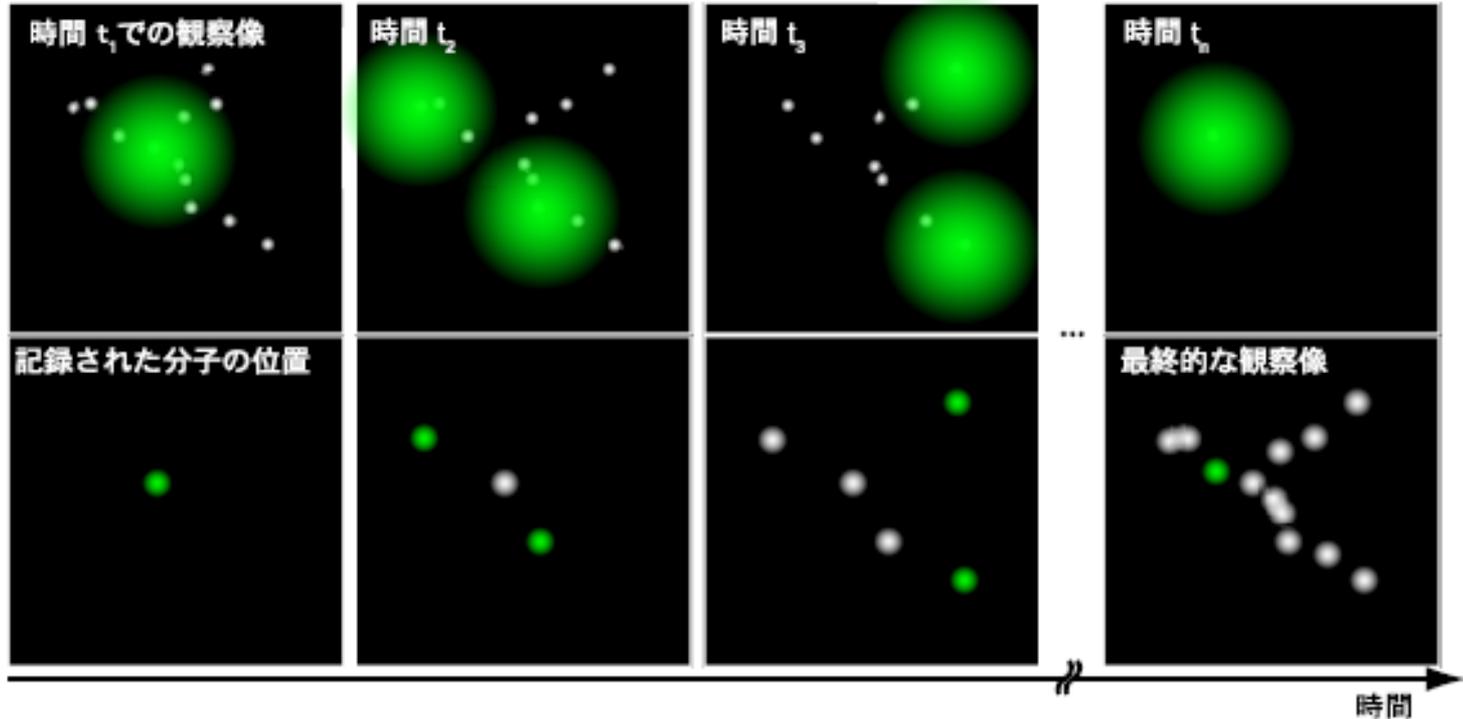


単粒子ナノ計測法を用いて、色素の位置を正確に測る。

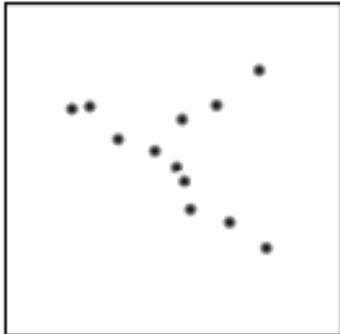
(a) 従来の蛍光顕微鏡像



(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)

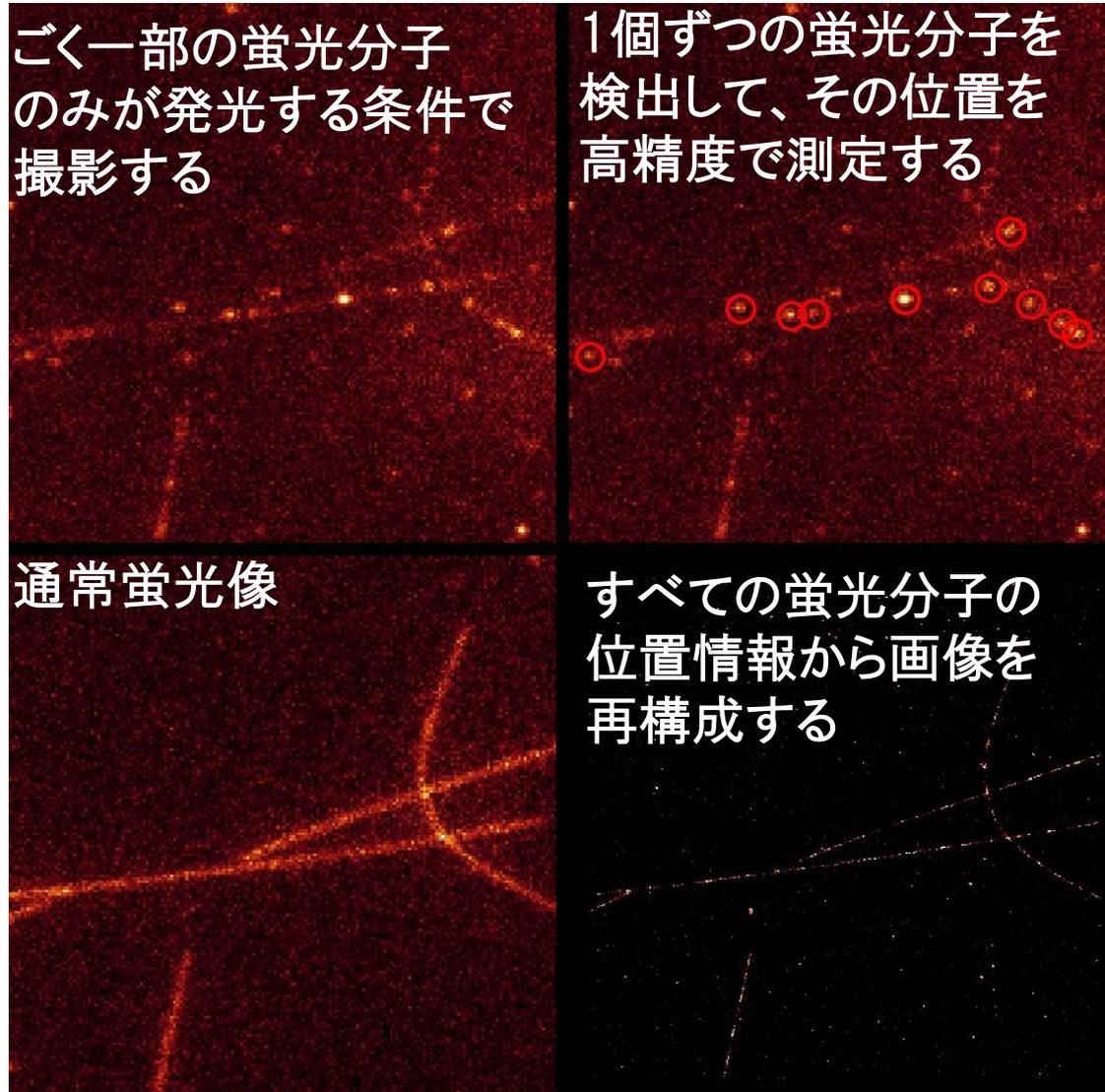


(b) 実際の分子の分布



# 単粒子ナノ計測法を用いて回折限界を破る

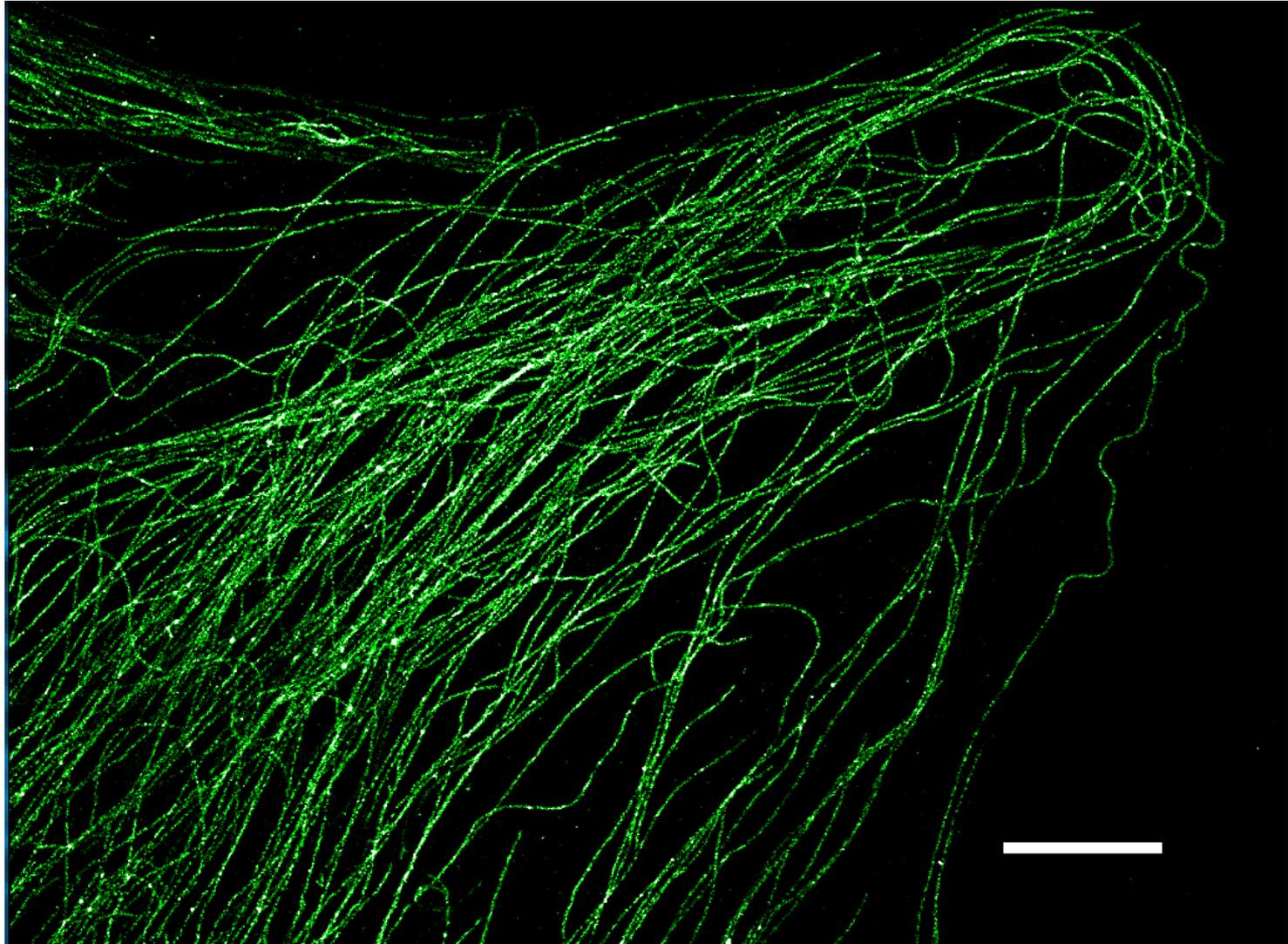
## ■微小管をローダミン色素で標識した実例



(独)理研・QBIC 岡田康志先生により頂きました。

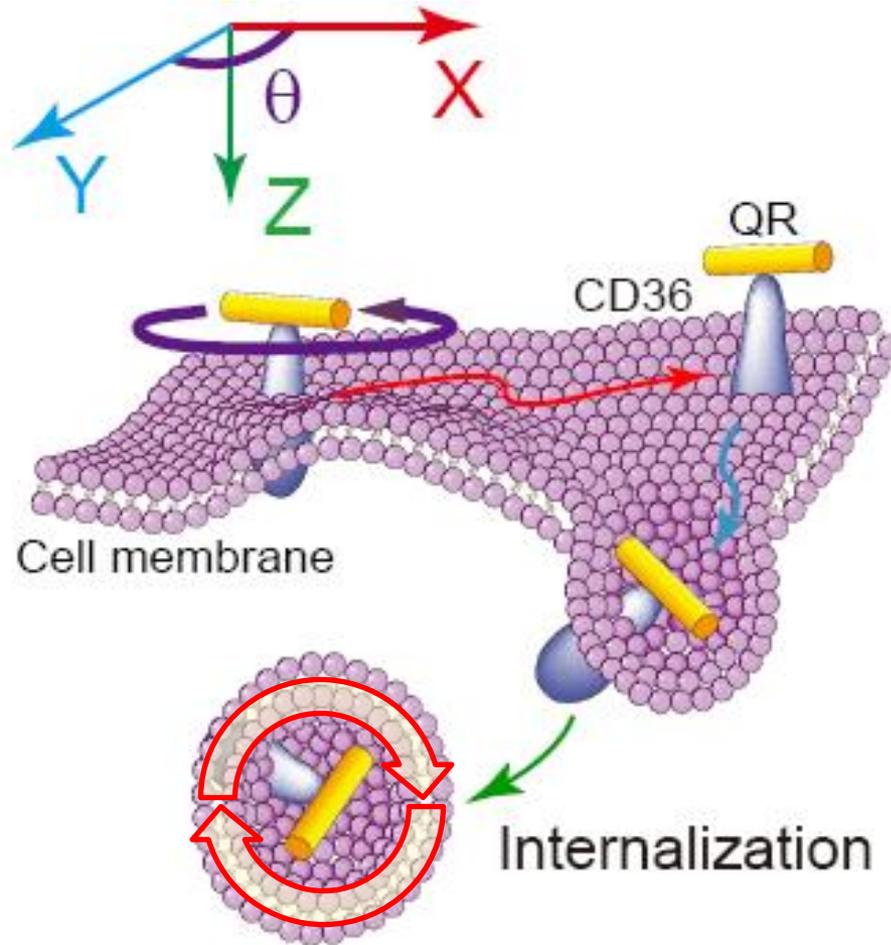
# 単粒子ナノ計測法を用いて回折限界を破る

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

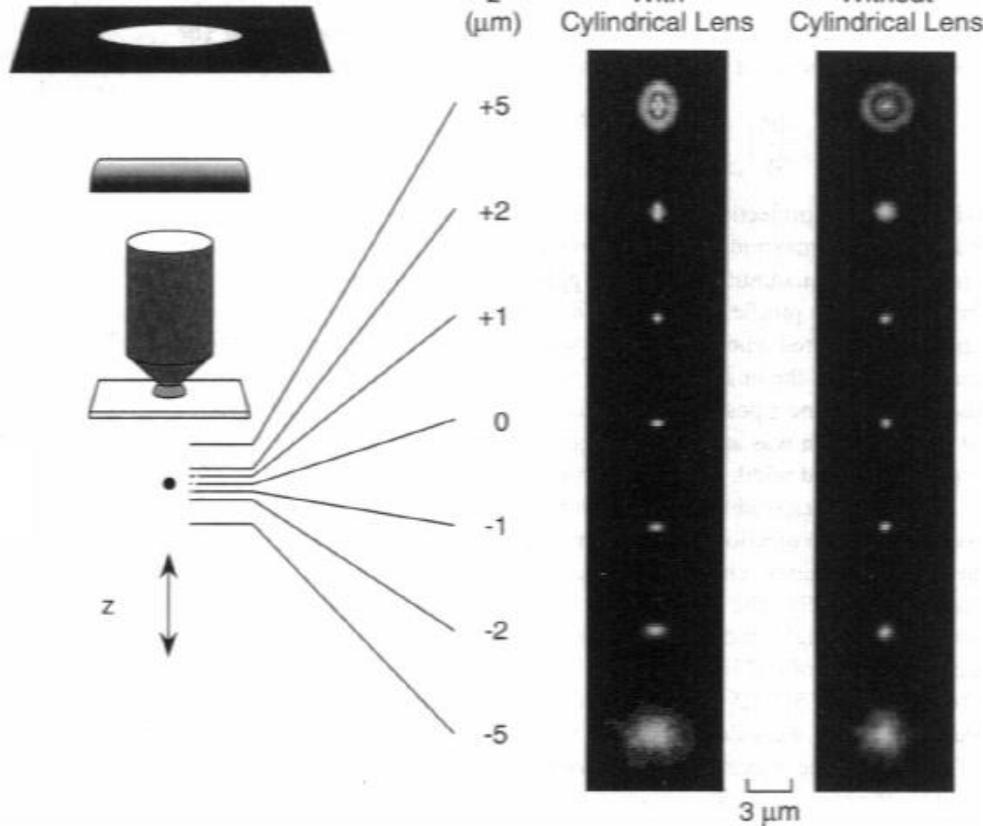


四次元単粒子追跡技術の開発

# シンドリカルレンズを用いた3次元粒子追跡法

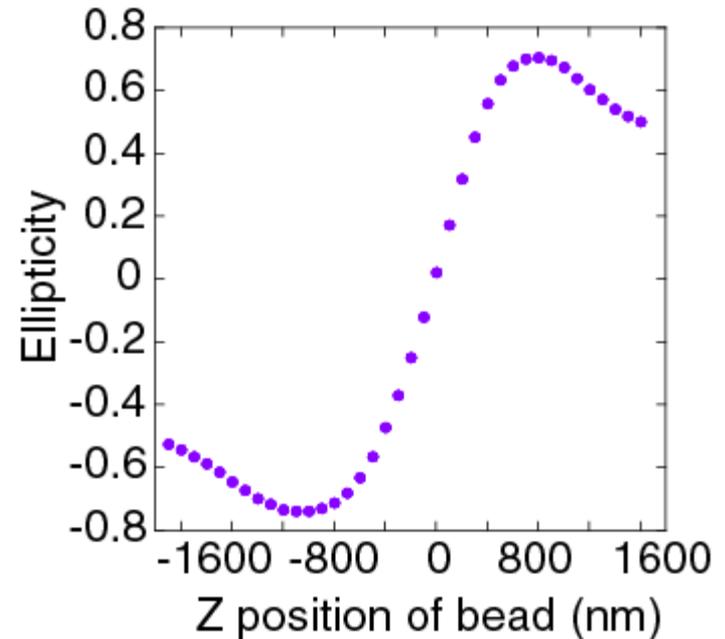
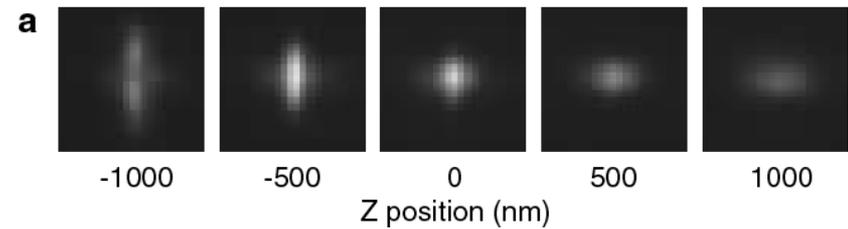
対物レンズ後方にシンドリカルレンズを挿入し、輝点を楕円化する。

## ■ 原理



HP Kao & AS Verkman, Biophysical journal, 1994

## ■ 実際の実験

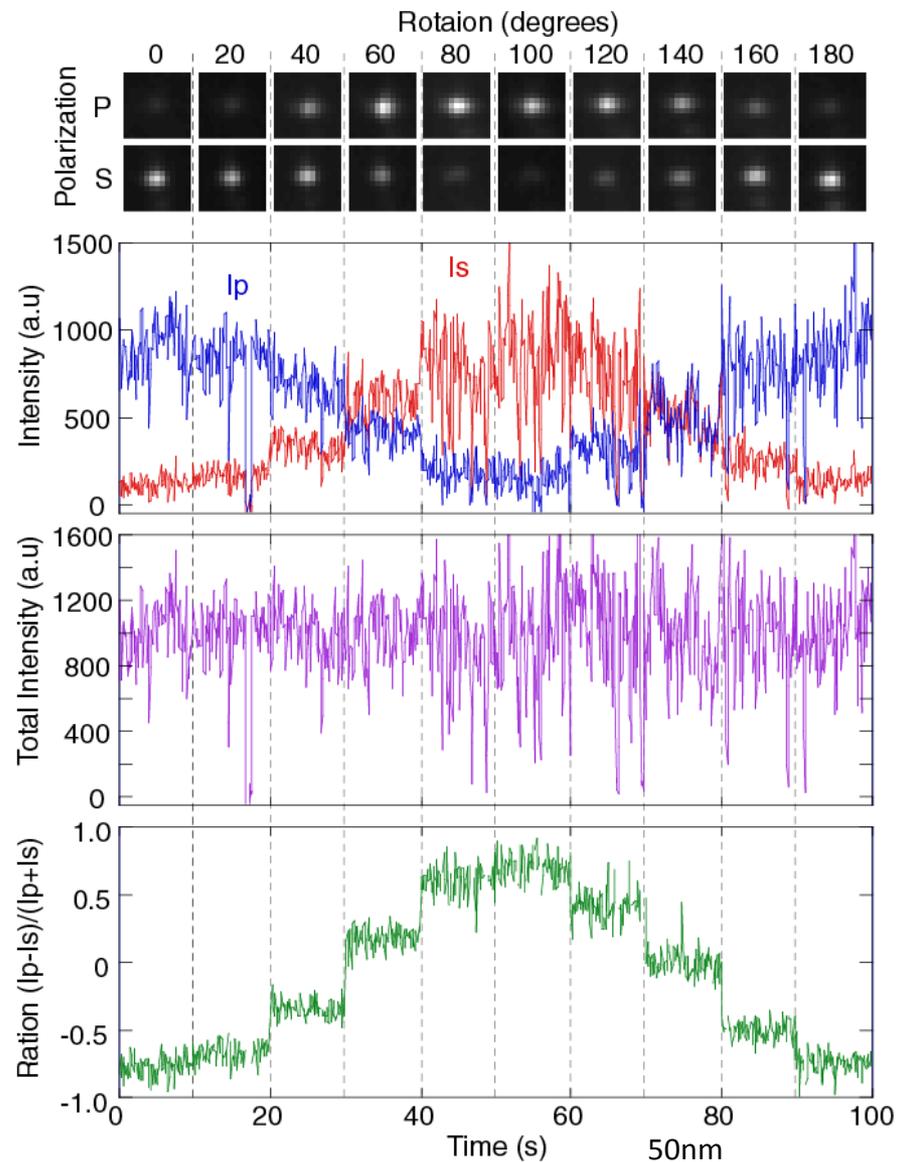
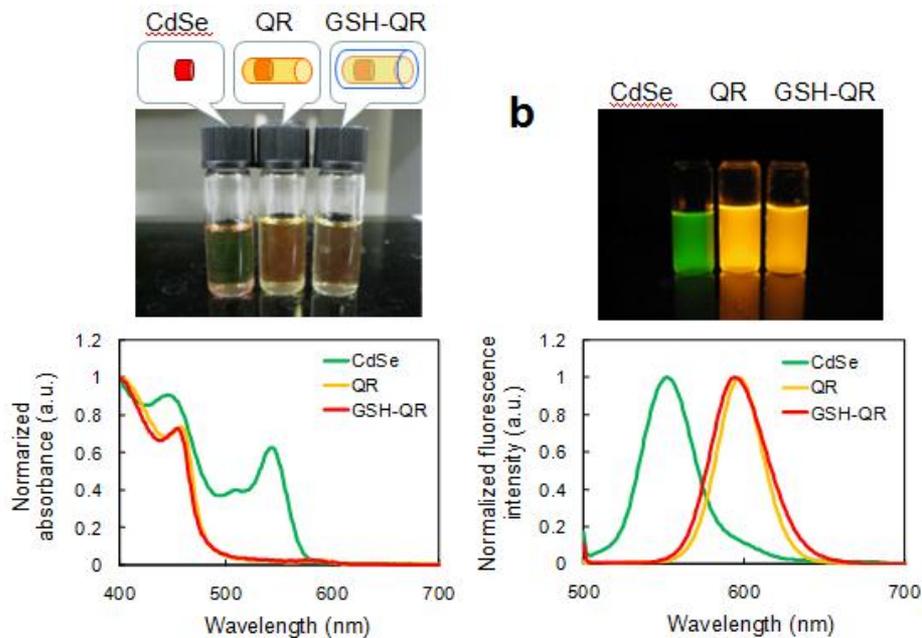


蛍光粒子のZ位置は、輝点の楕円率から求めることができる。

# 蛍光粒子の偏光による4軸目(回転, $\theta$ )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。

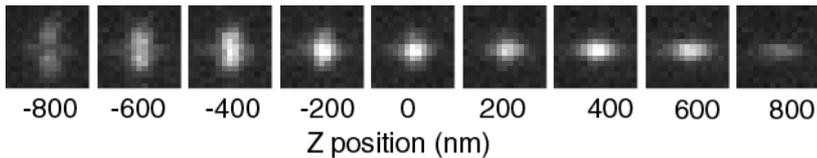
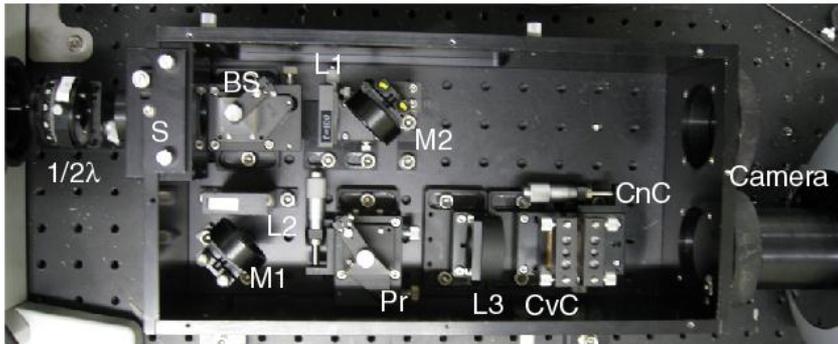
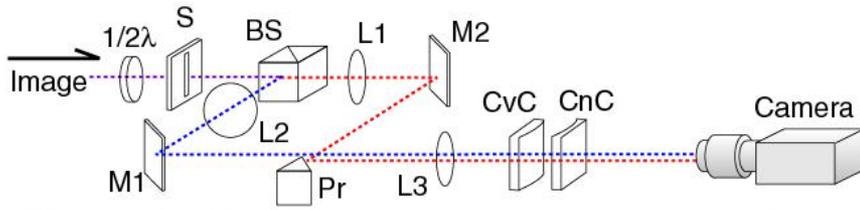
## ■ 偏光性量子ロッド (Qrods)



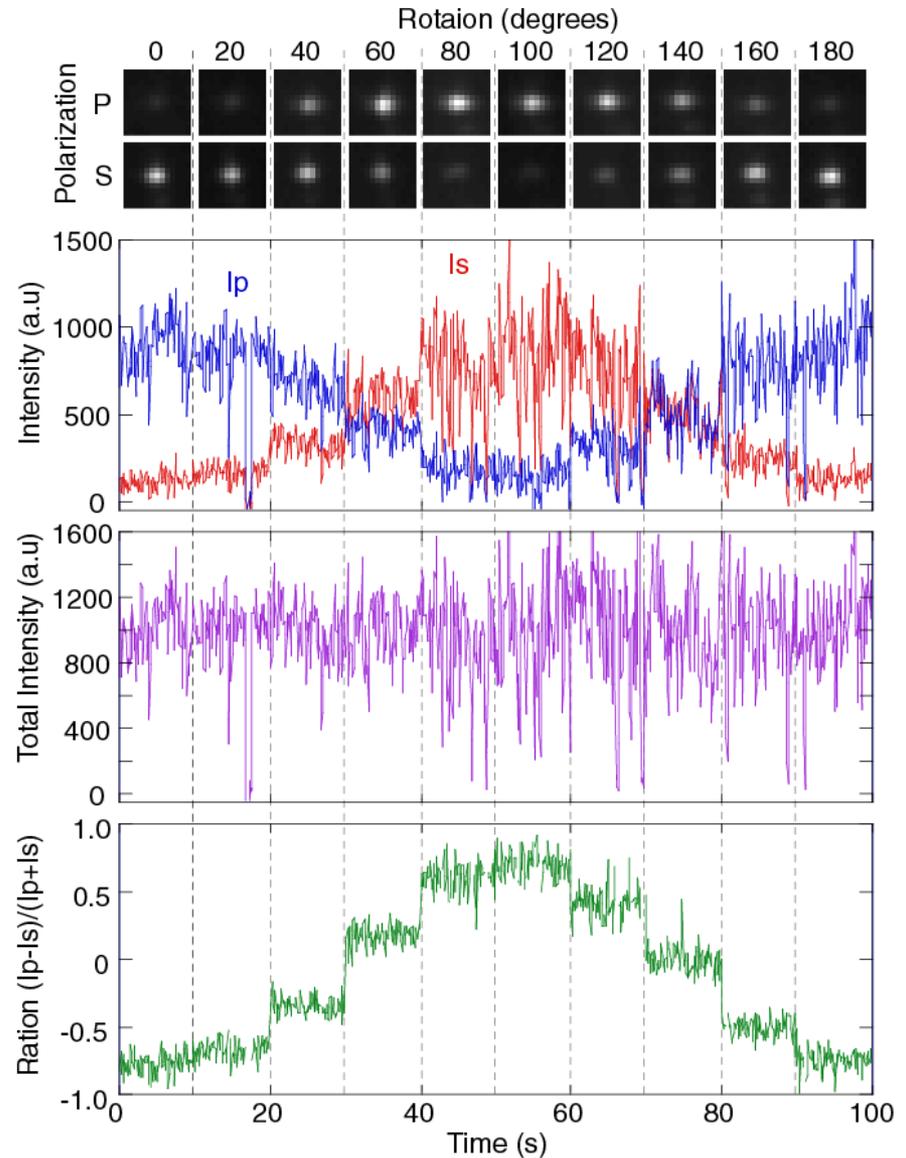
# 四次元(xyz- $\theta$ )単粒子追跡法;

## 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

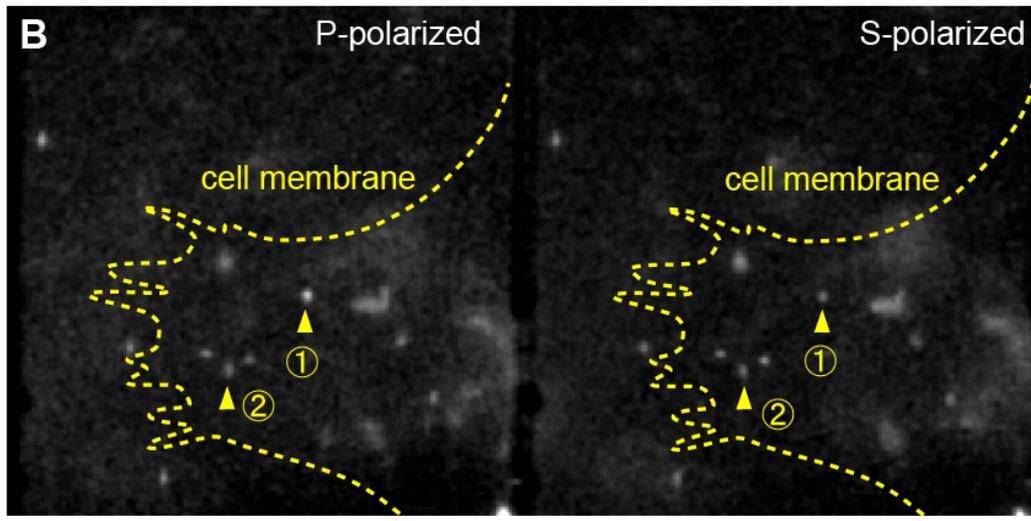
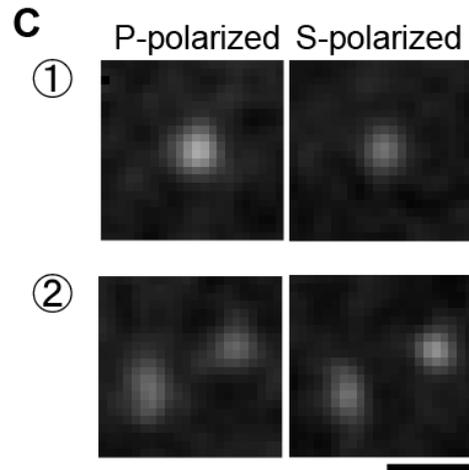
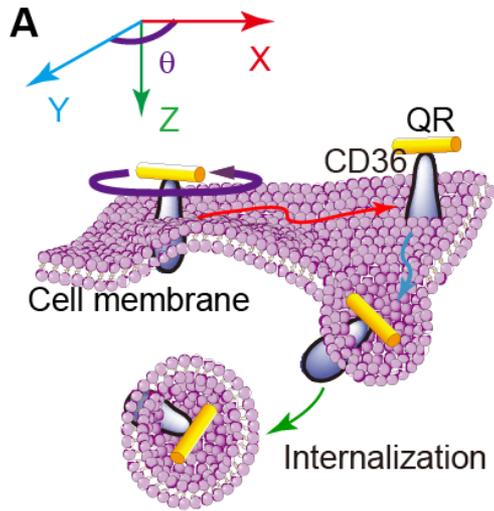


- X, Y → 輝点の中心位置 (5 nm)
- Z → 楕円率 (17 nm)
- q → 偏光度 (6 degree)

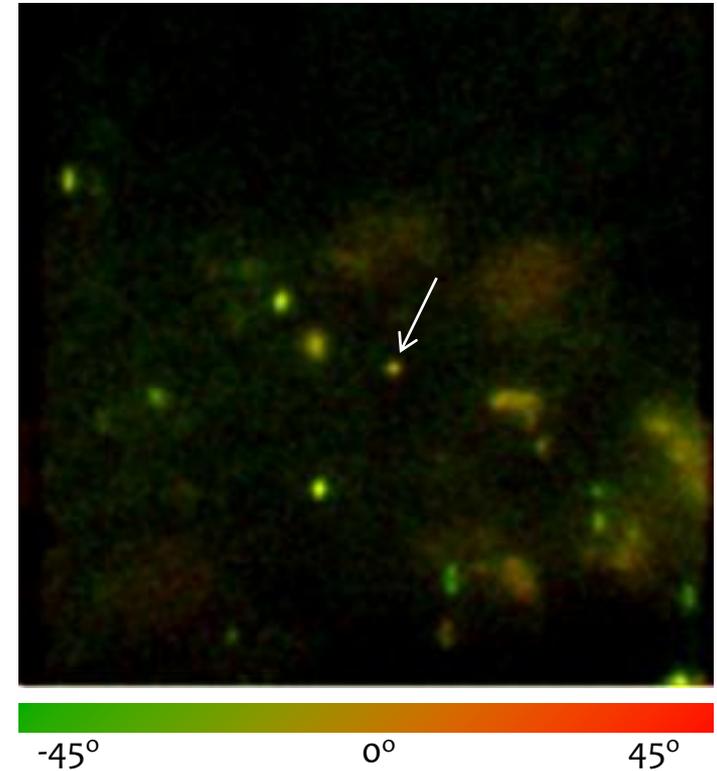


# 膜蛋白質の四次元(xyz- $\theta$ )追跡

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



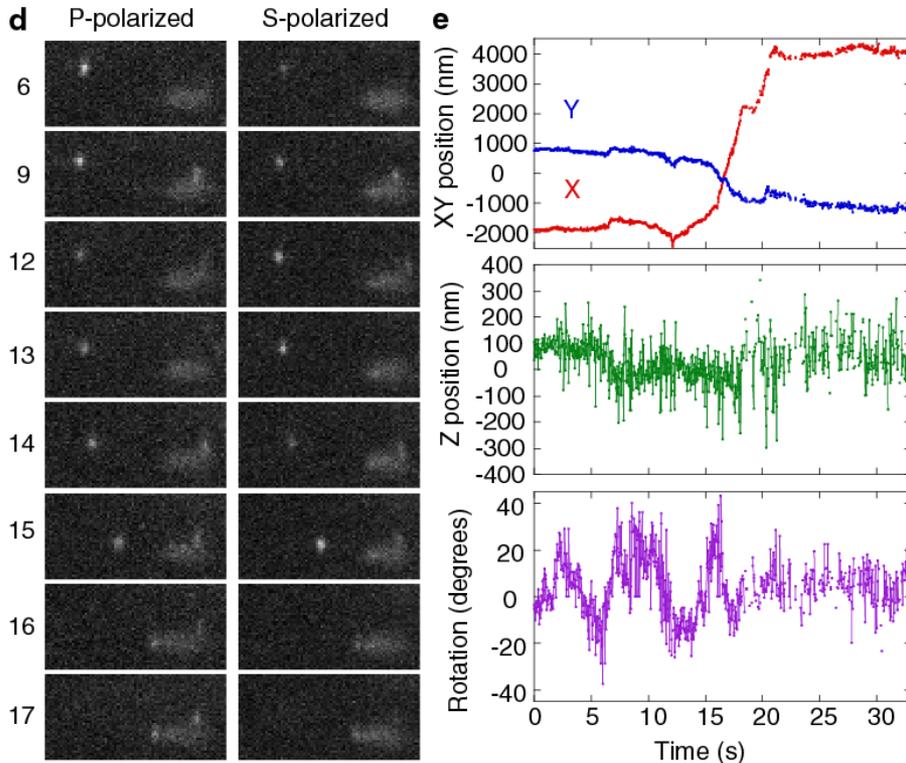
■ 回転を色で示した動画



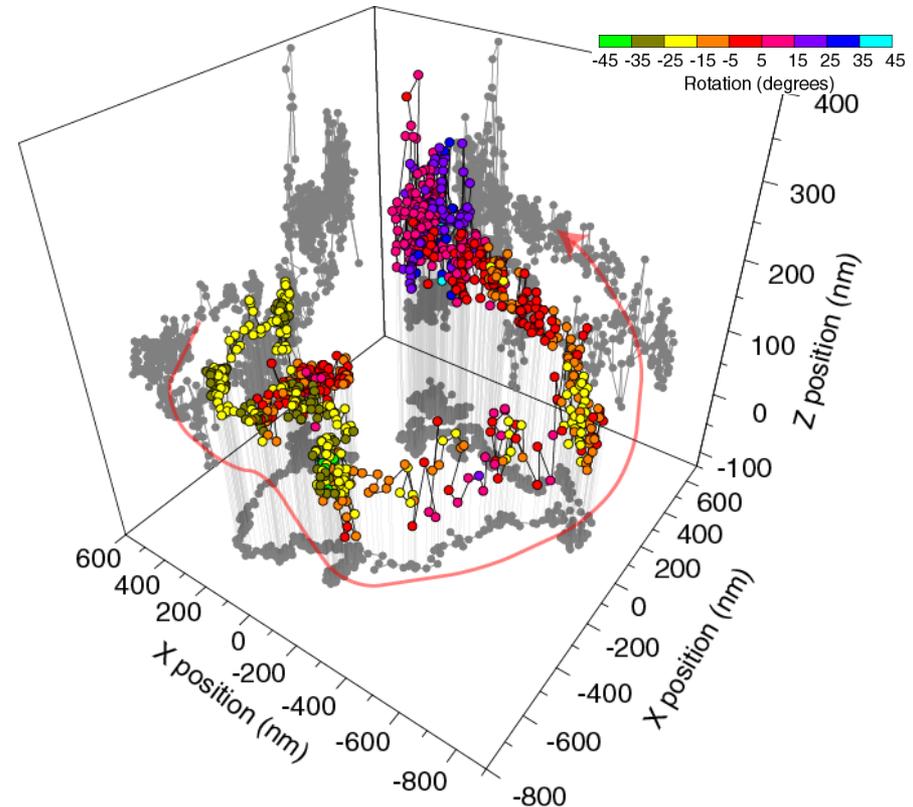
# 膜蛋白質の四次元(xyz- $\theta$ )追跡

## 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。

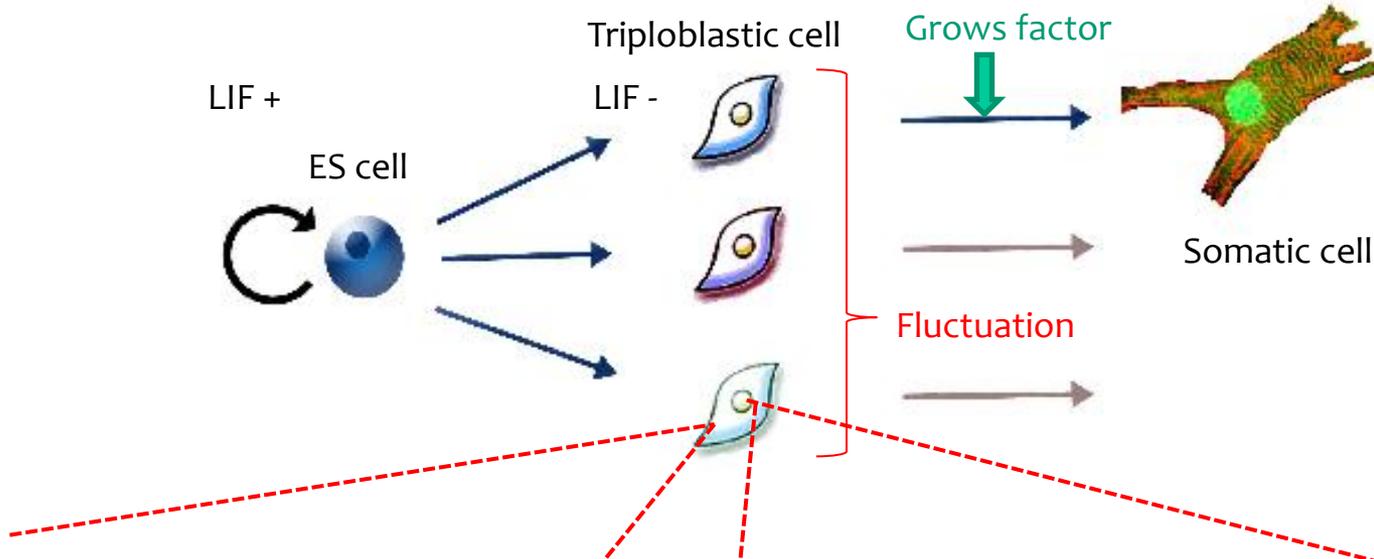
# 本日のテーマ

光で分解能以下の情報を取得する。

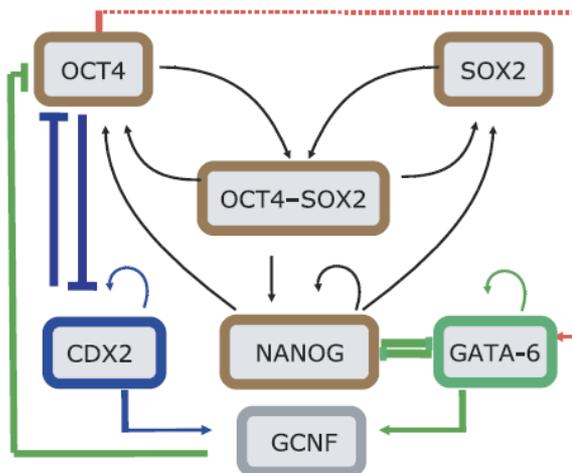
- ① 一点の『位置』であれば、nm精度で計測可能  
シリンドリカル光学と偏光光学により、四次元化。

# 細胞の中の『状態』を観察することができるか？

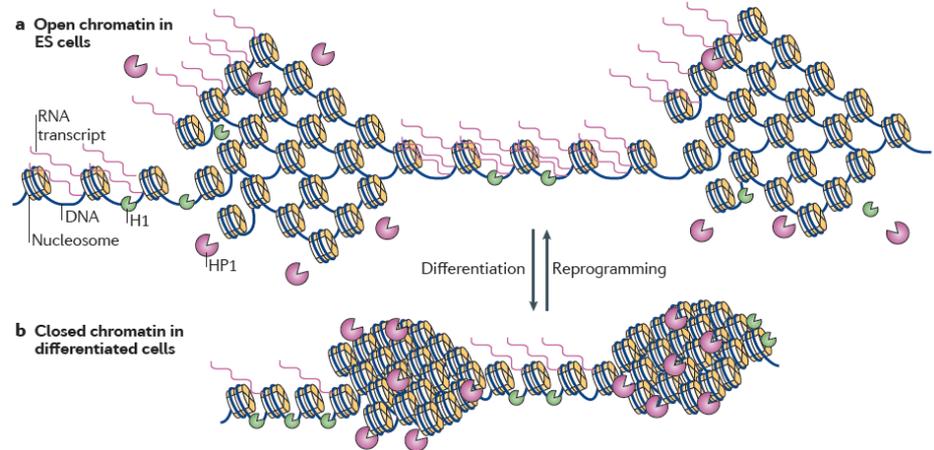
細胞の中は、細胞の状態によって、様々に変化している。



## ■ 遺伝子発現ネットワーク



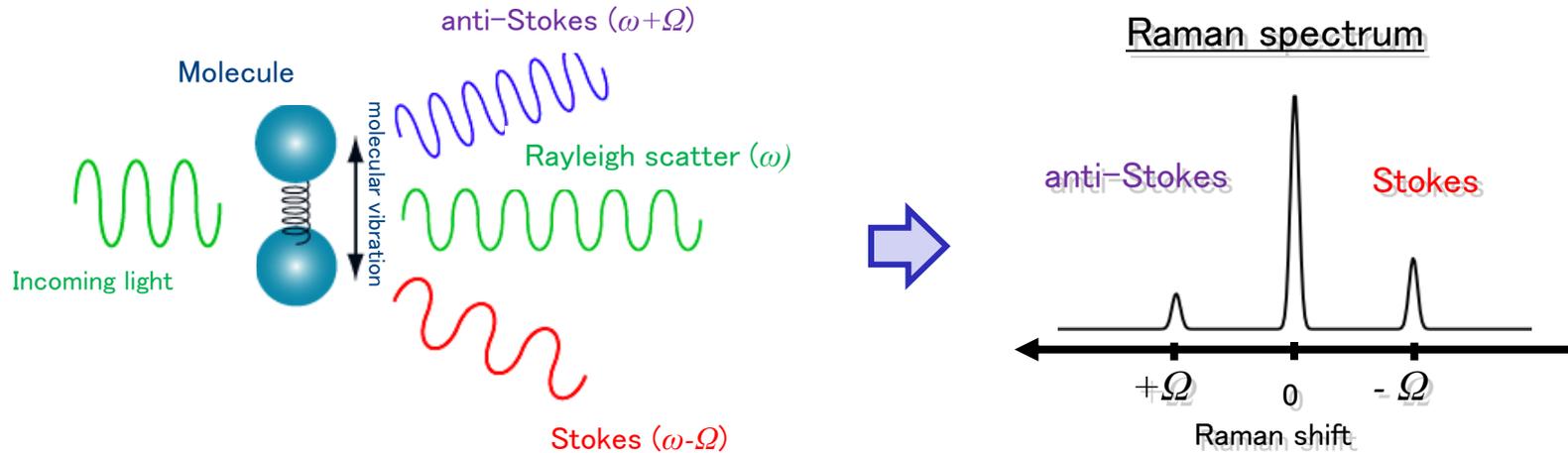
## ■ クロマチン構造の変化



# 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

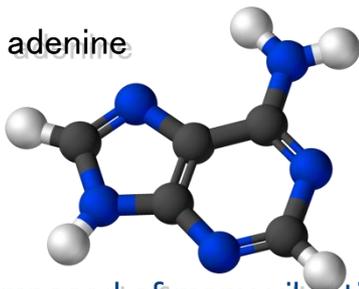
Raman spectroscopy = intrinsic molecular vibration spectroscopy



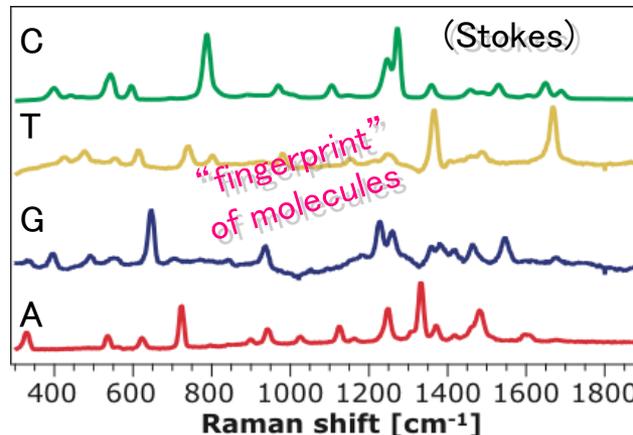
例えば、ラマン分光を用いれば、ヌクレオチドの種類を識別できる。

Polyatomic DNA molecule

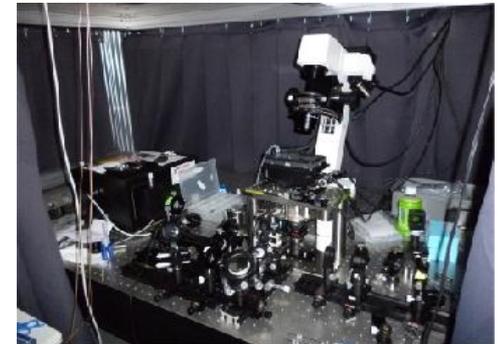
adenine



composed of many vibrational modes.



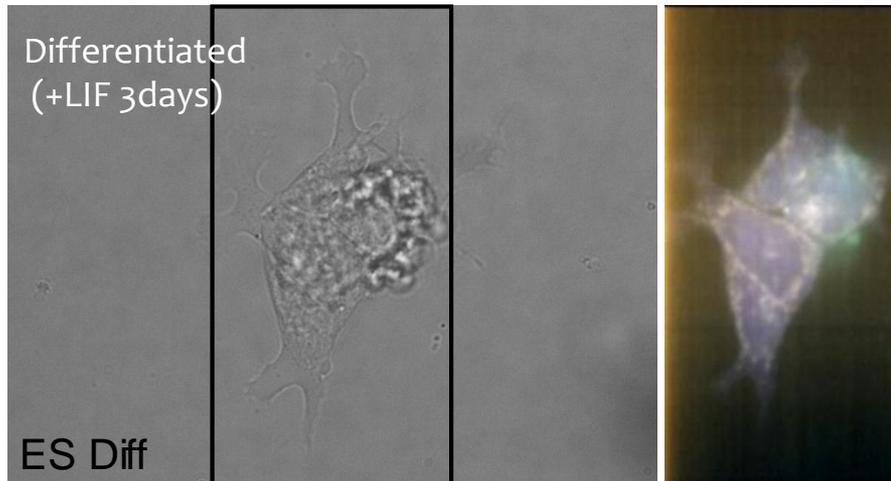
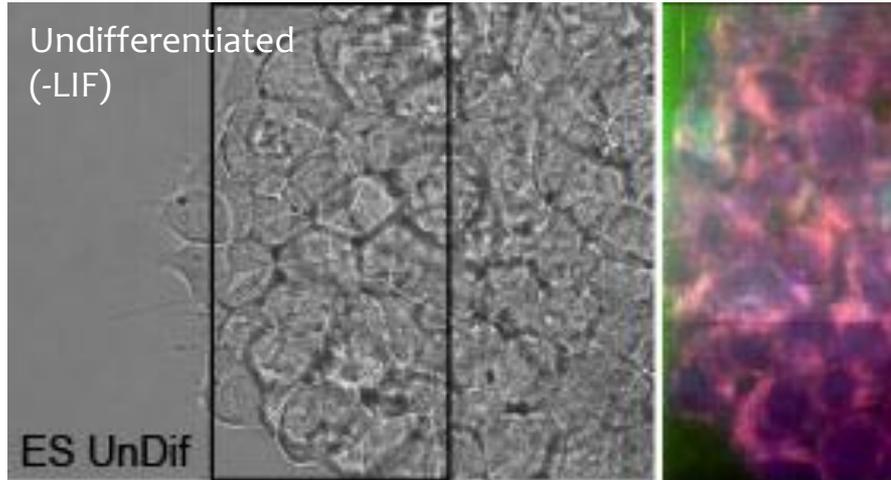
我々のラマン顕微鏡



# 核の状態を非染色で観察する

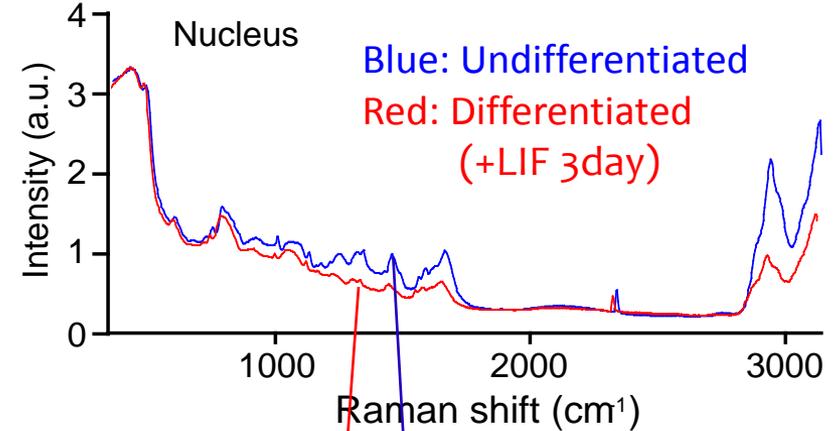
ES細胞が分化すると、細胞内のラマン分光スペクトルが変化する。

## ■ ラマン分光イメージング

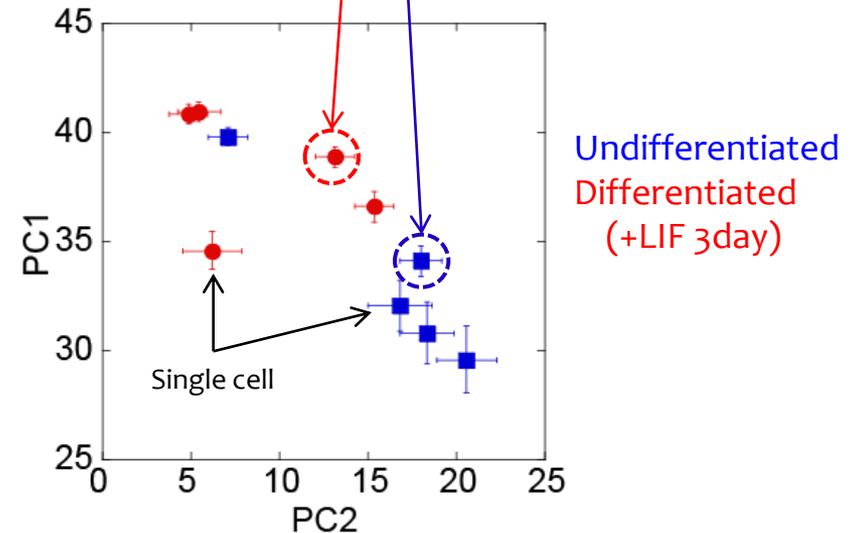


Red: 750 cm<sup>-1</sup> (Cytochrome C) Blue: 2877 cm<sup>-1</sup> (Lipid)  
Green: 1685 cm<sup>-1</sup> (Phenyl ring)

## ■ ラマン分光スペクトル

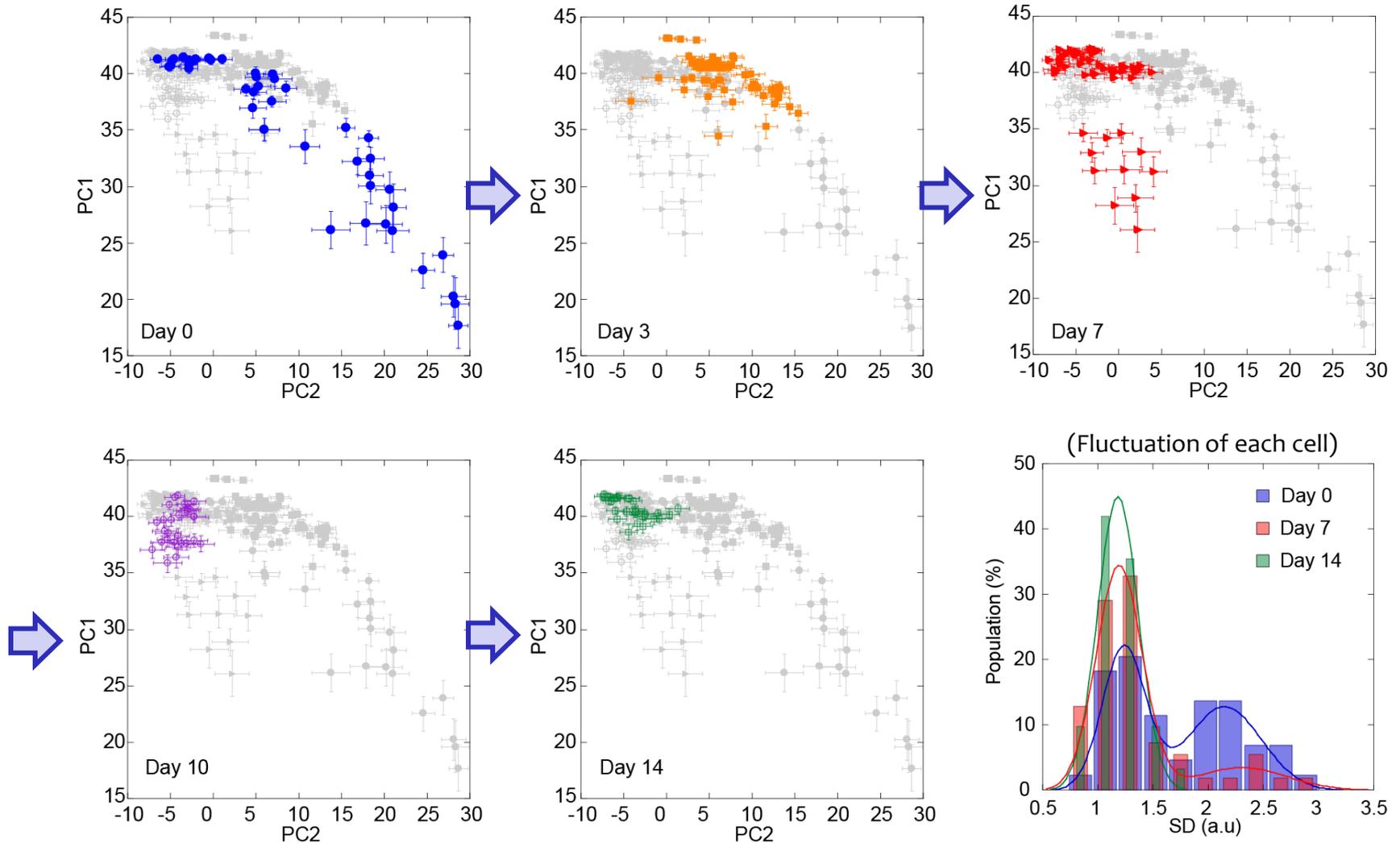


## ■ 主成分解析によるプロット



# 核の状態を非染色で追跡する

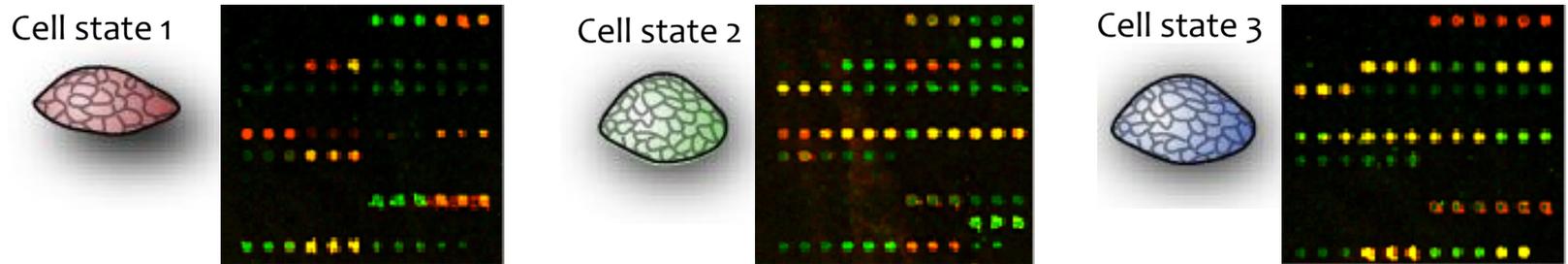
## ■ ES細胞が分化(LIF除去)する時のラマン分光スペクトルの変化



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

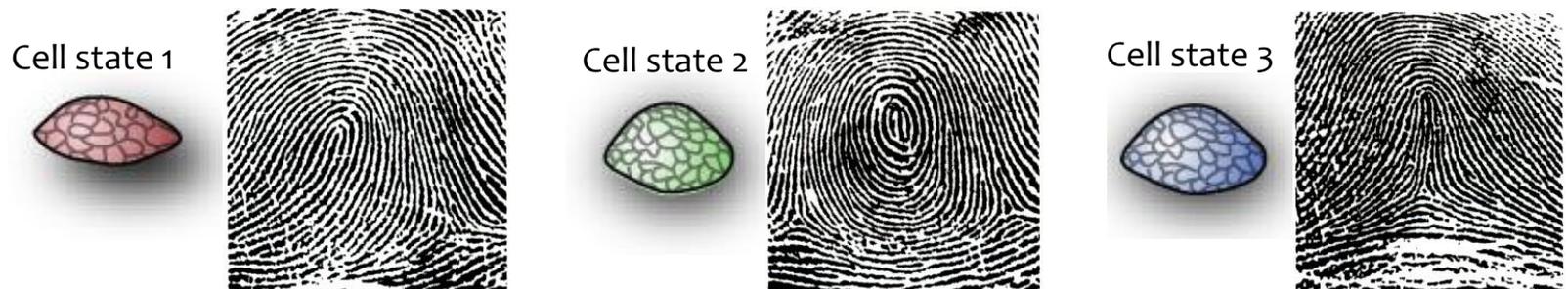
従来、細胞の状態を定義するためには、遺伝子発現パターンなどの網羅的なデータを用いてきた。



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。

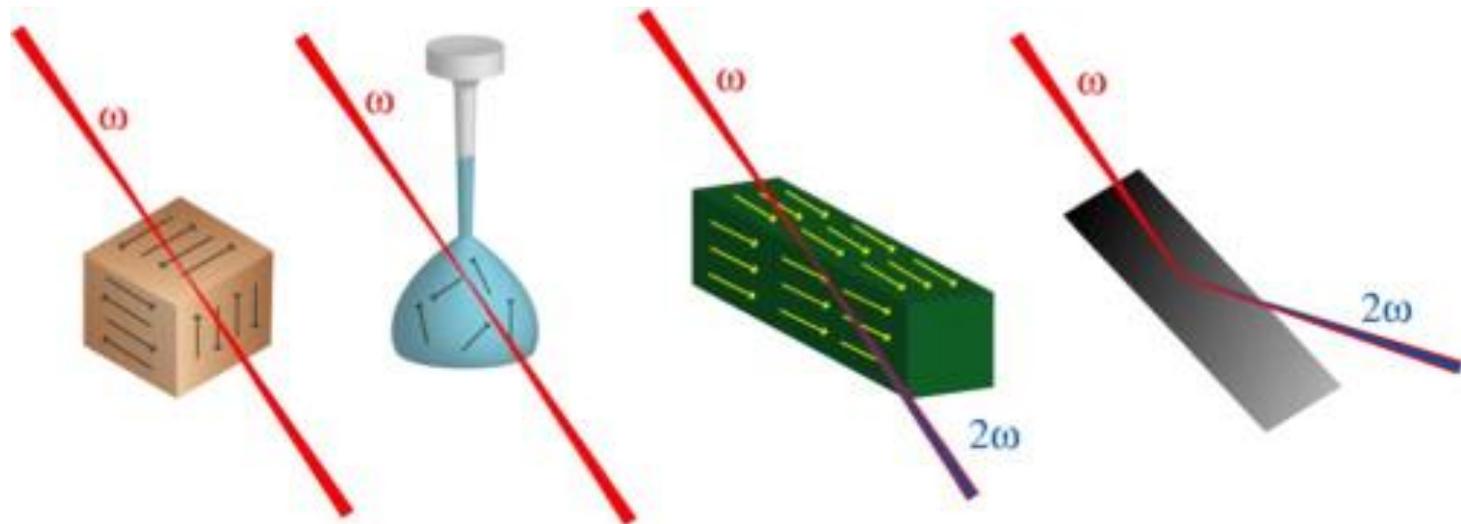


ラマンスペクトルは、細胞の状態によって異なる →細胞指紋



# 分子の分極状態を反映する光 ~第二次高調波~

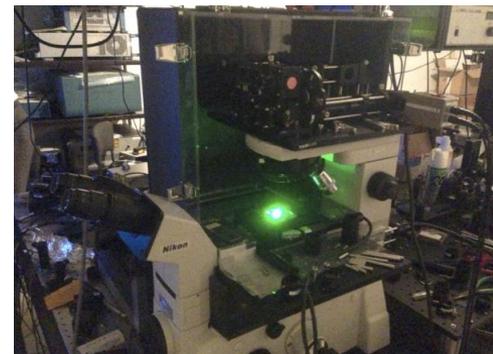
第二次高調波は、元となる材料の構造情報を反映した光である。



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

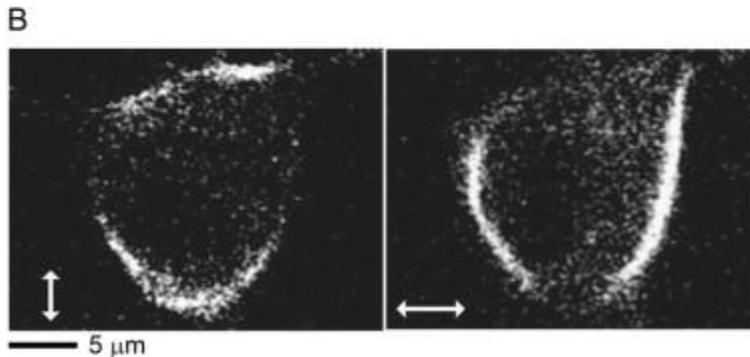
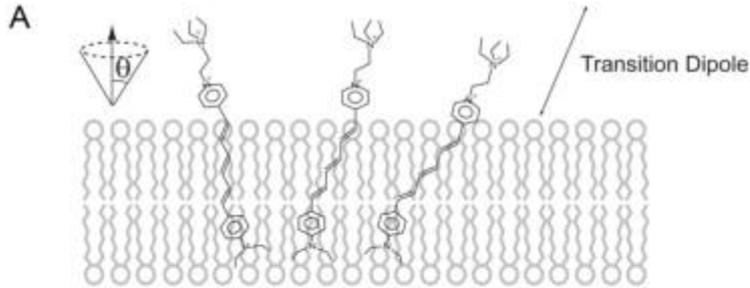
- ・媒質に入射した基本光の2倍の周波数のSHG光が発生  
媒質が反転中心を持つときには起こらない。  
一般的な固体や液体ではSHGは起こらない。
- ・物質が反転中心を持たない多くの場合にSHG光が発生  
その物質は分極を有する。  
分極反転させた強誘電体や分極処理された高分子等。

我々のSHG顕微鏡

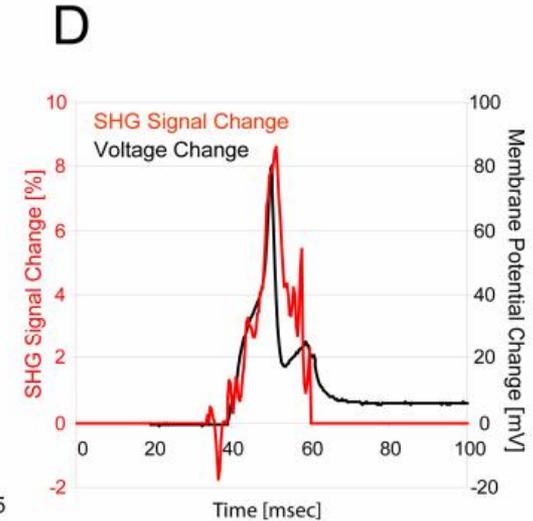
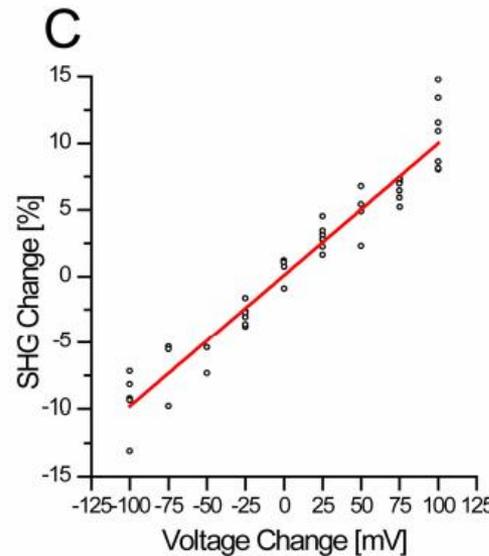
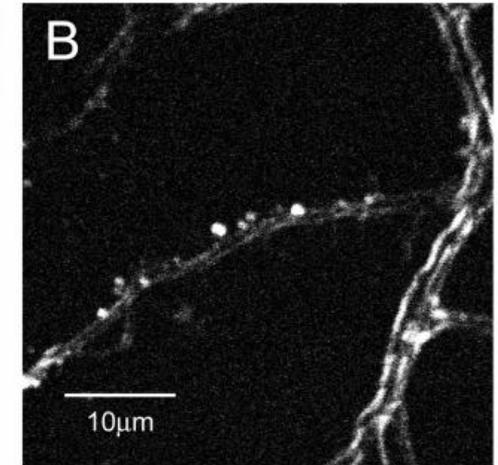
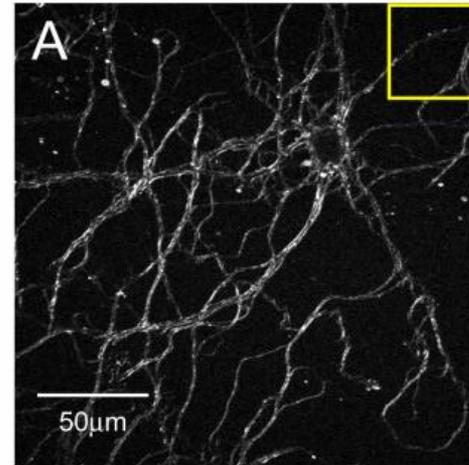


# 分子の分極状態を反映する光 ~第二次高調波~

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。

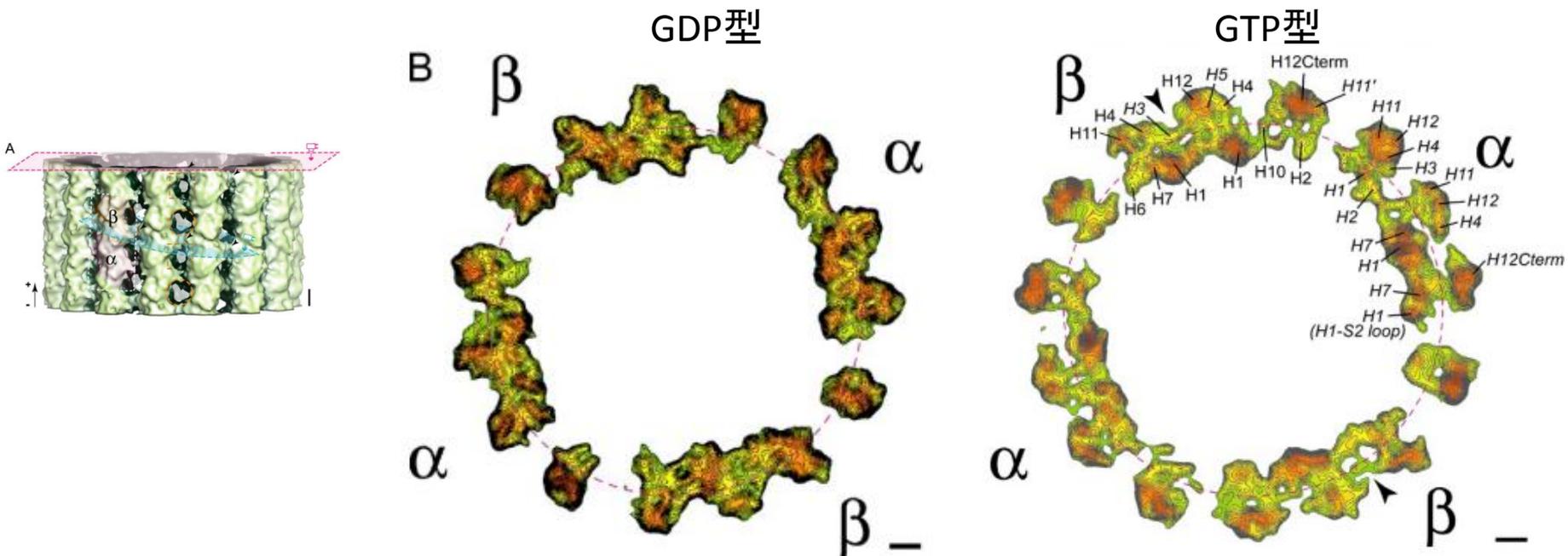
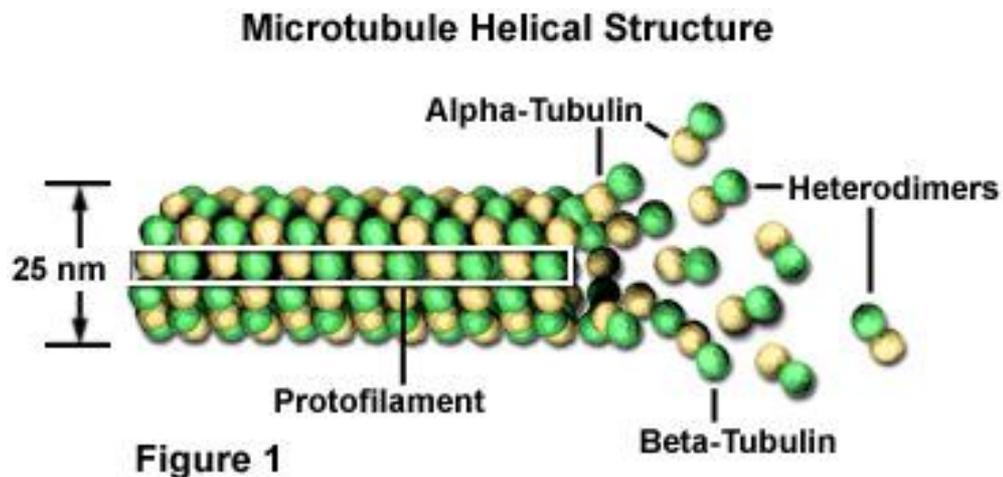
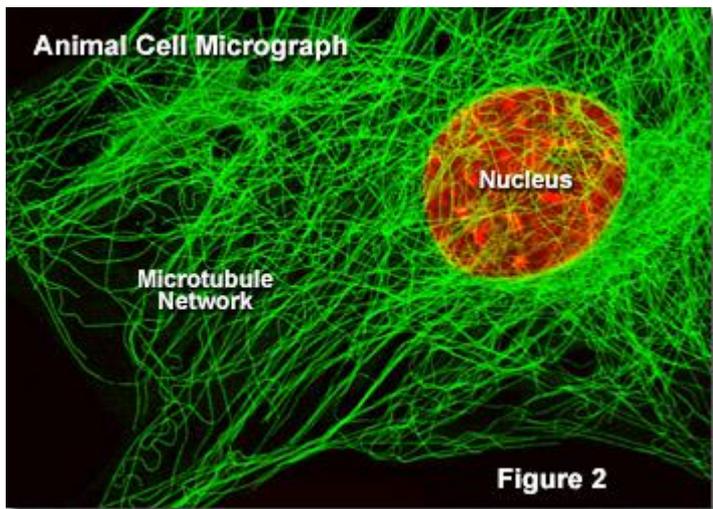


Jiang J, et al, RBiophys J. 2007 93:L26-8



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

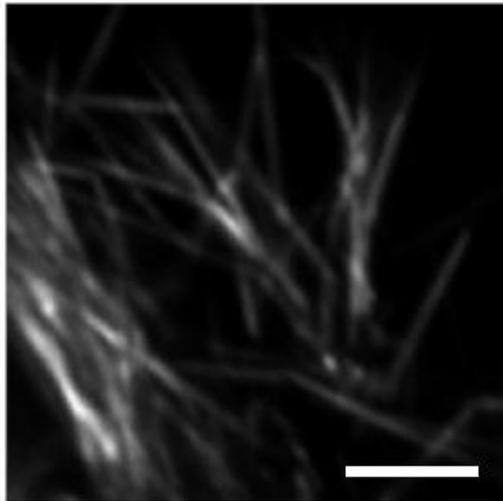


# 微小管の分極状態をSHG信号で取得する

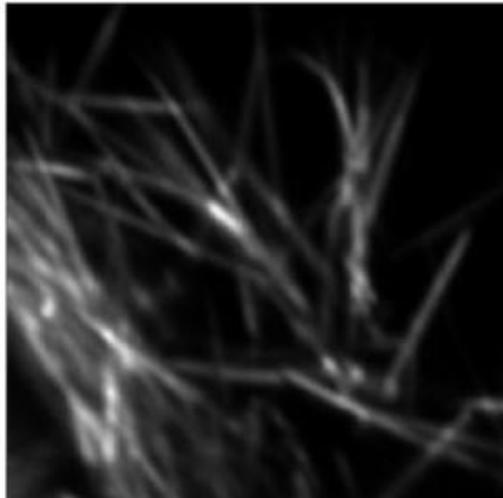
SHG顕微鏡を用いれば、微小管を非染色で観察できる。

Polarization  
angle

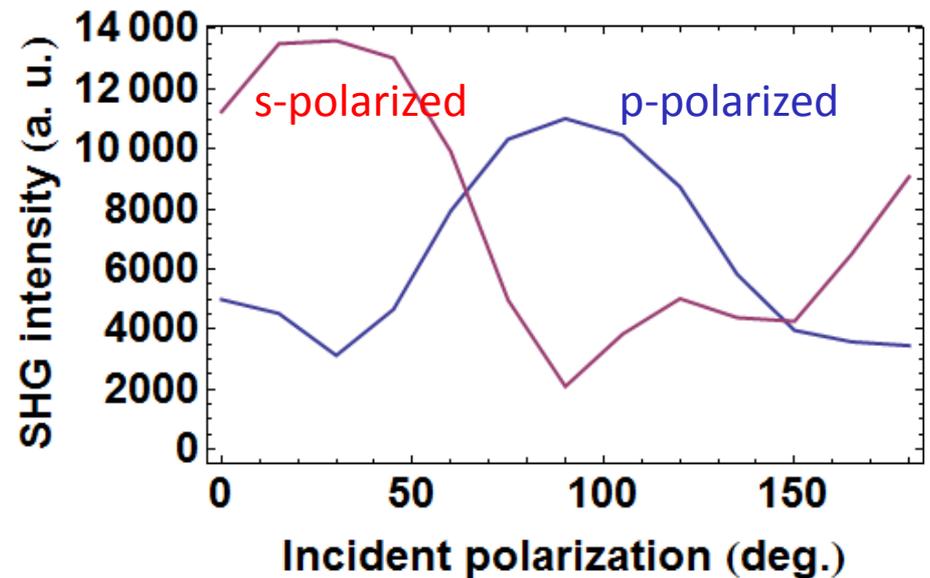
0 deg.



90 deg.



■ 微小管(束)のSHGイメージング、偏光異方性

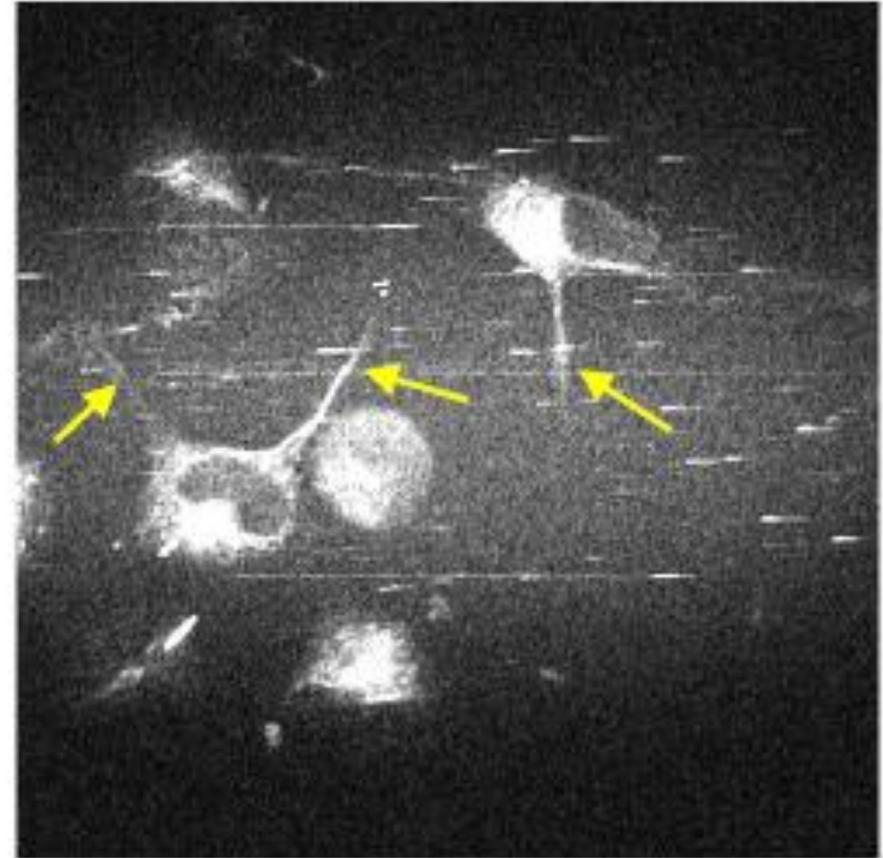
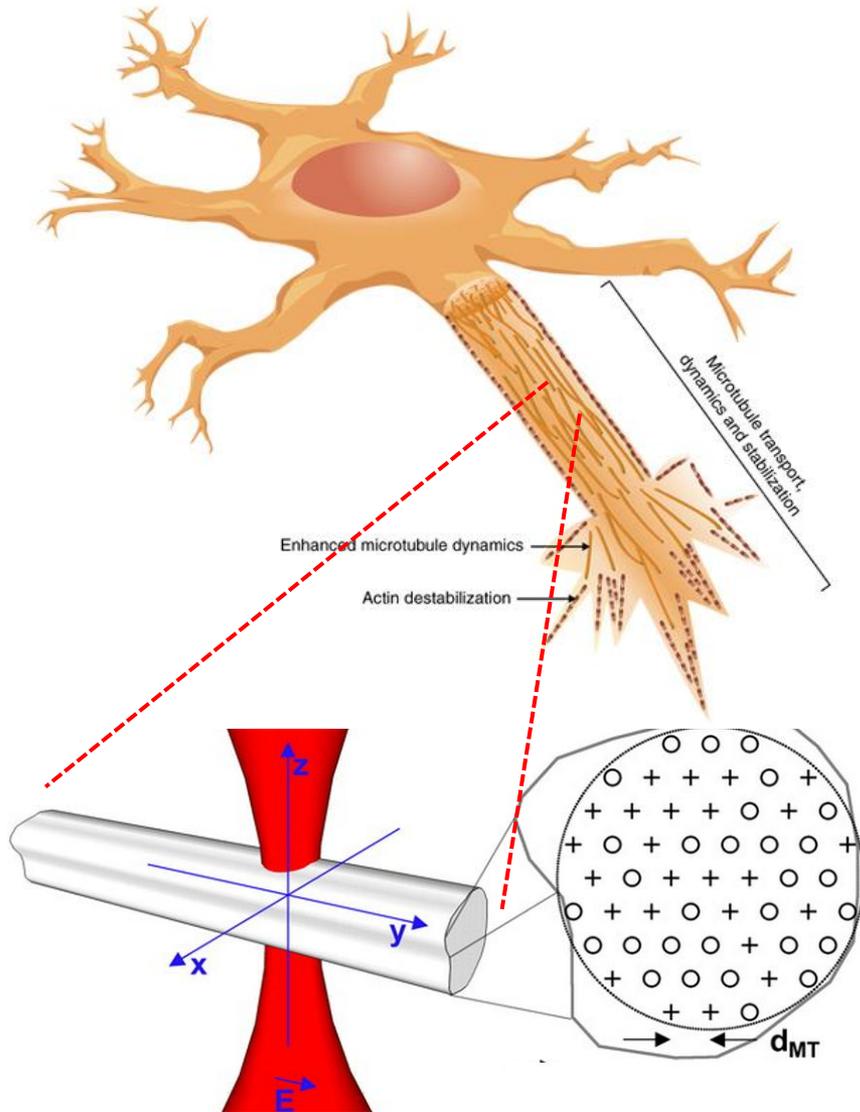


取得されるSHG信号は、  
微小管が持つ分極を反映している。

# 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。

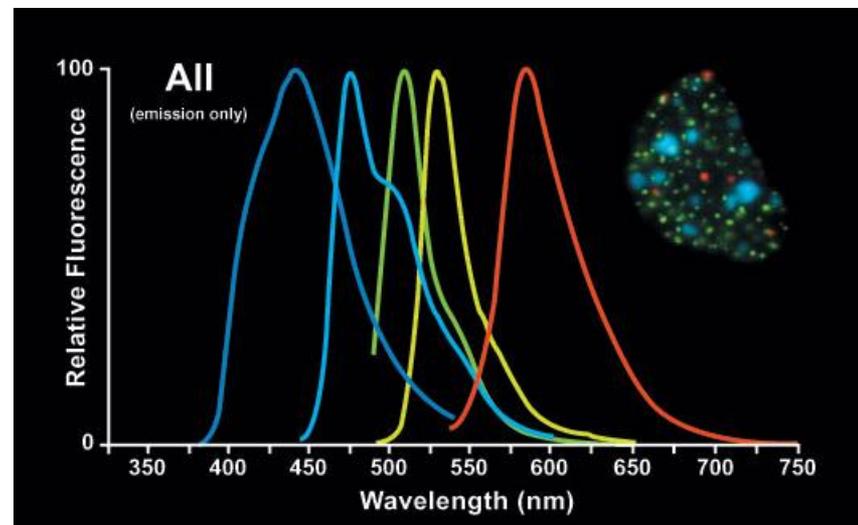
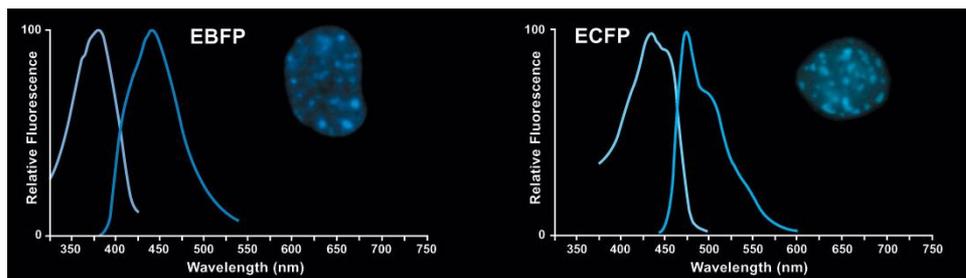
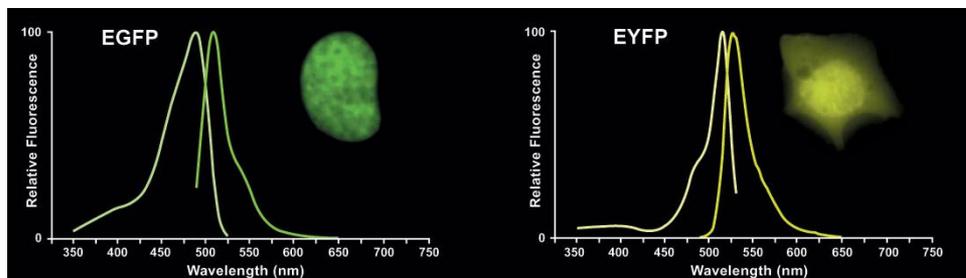
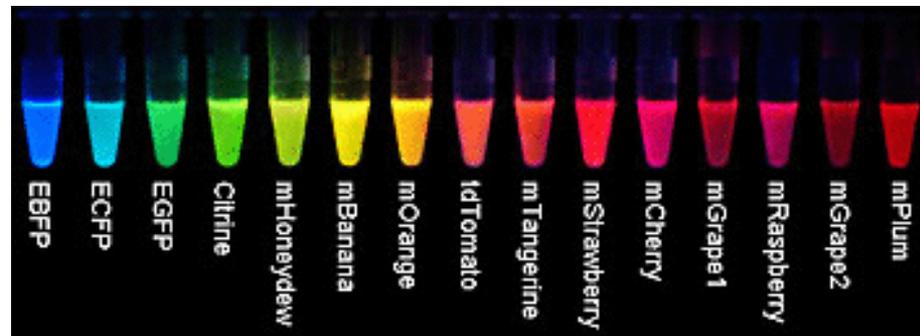
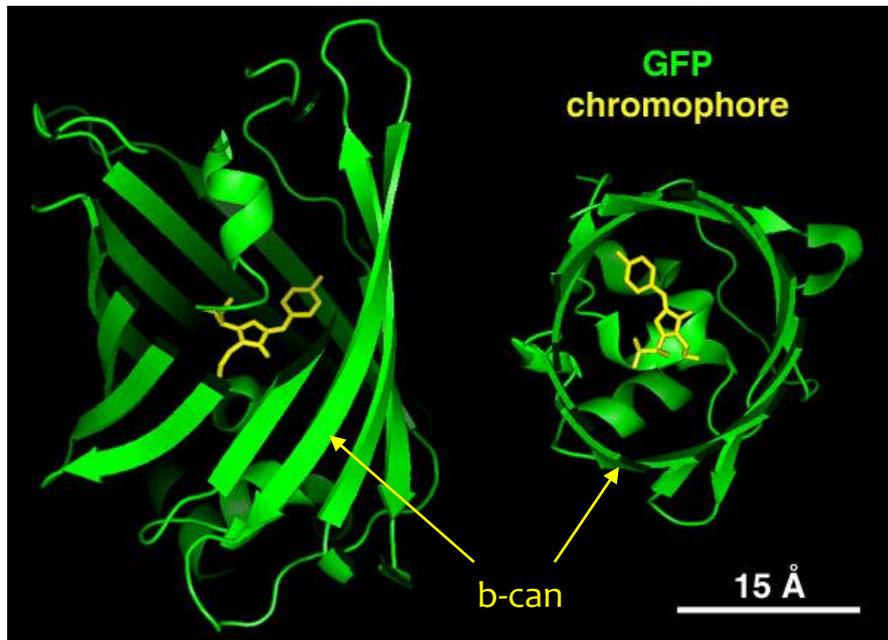
# 本日のテーマ

## 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。

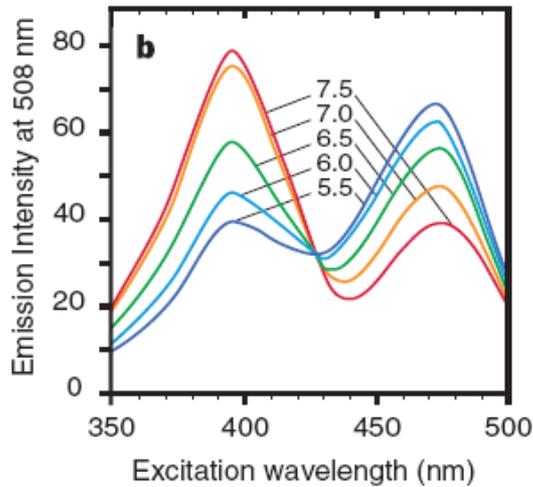
# 状態を蛍光に反映させる技術 ~蛍光蛋白質~

遺伝子でコードされた光る蛋白質



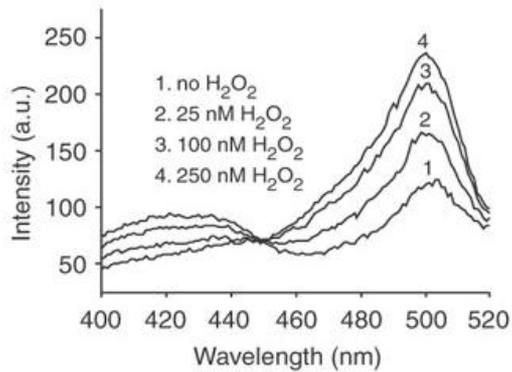
# 様々な環境感受性蛍光蛋白質

## ■ pH sensor (SynaptopHluorin)



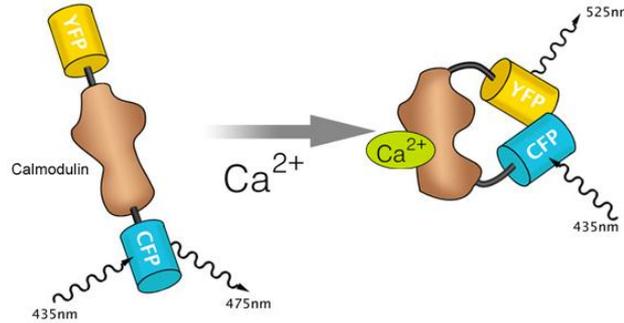
Miesenbock G, et al., Nature 394: 192–195, 1998.

## ■ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensor (HyPer)



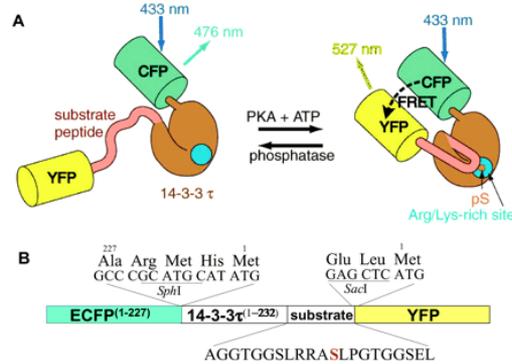
Belousov VV, et al., Nat Methods 3: 281–286, 2006

## ■ Ca<sup>2+</sup> conc. (Cameleon)



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

## ■ PKA activity (AKAR1)

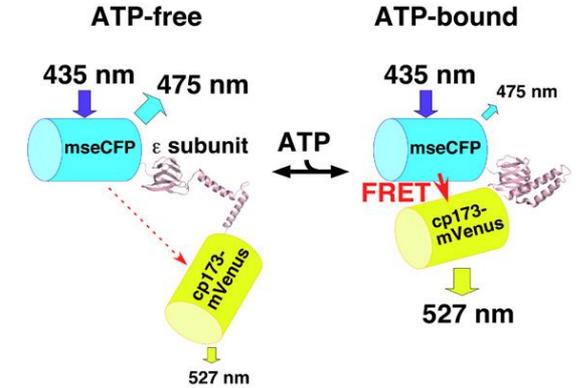


Zhang J, et al., PNAS 98: 14997–15002, 2001.

## ■ Other

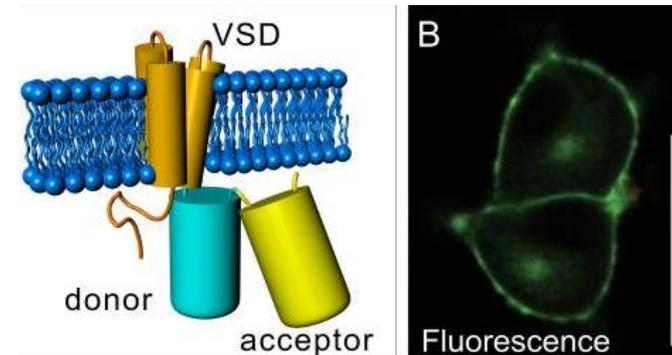
Redox potential (roGFP1)  
Caspase-3 activity (Casper3)

## ■ ATP conc. (A-Team)



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

## ■ Membrane Potential VSFP2.4)



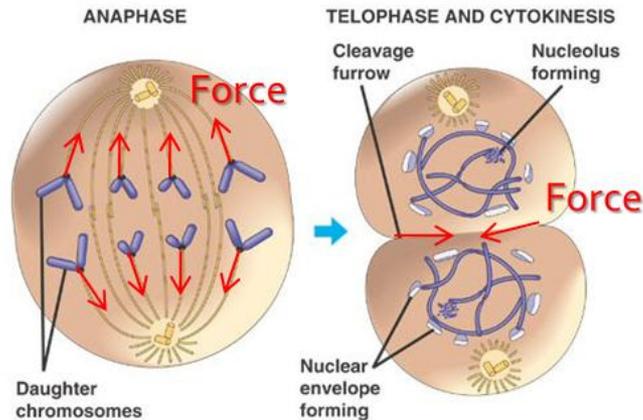
Mutoh H, et al., PLoS ONE 4: e4555, 2009.

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

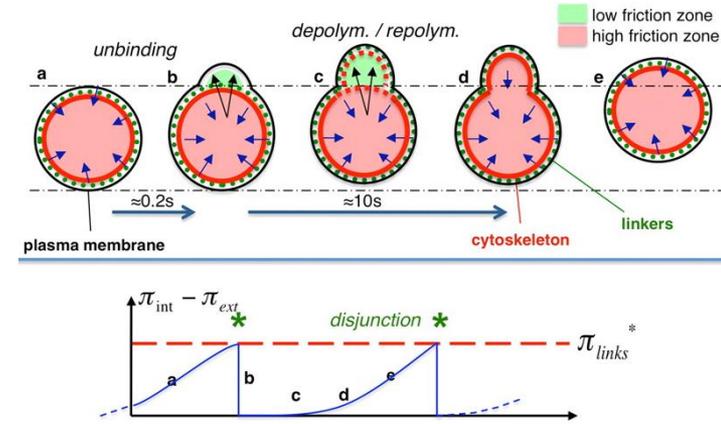
## 力学パラメータを色の変化として検出する

### ■蛋白質が発する力



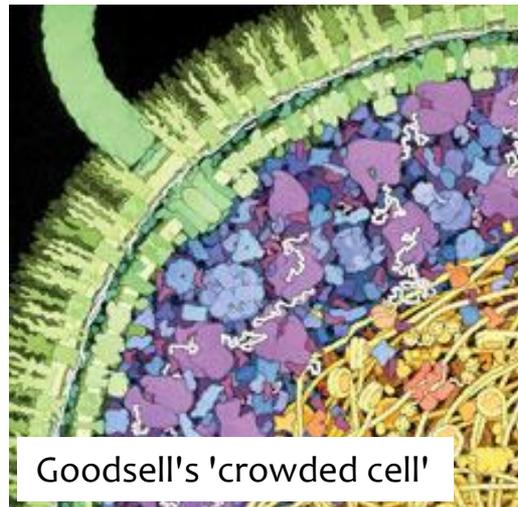
Ichimura T, et al., Chem comm, 2012

### ■細胞内圧力

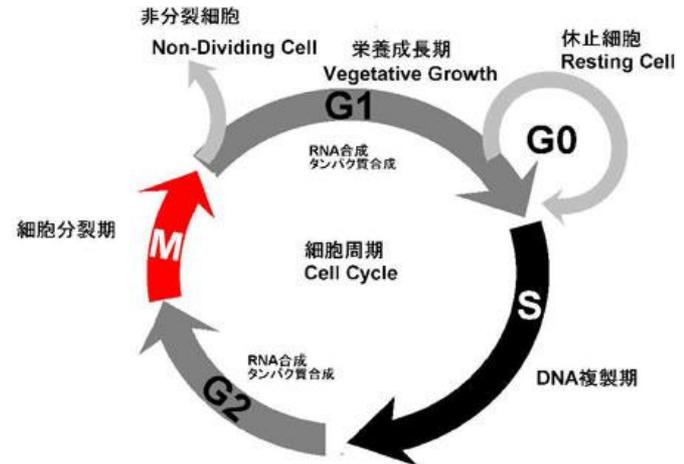


Watanabe T, et al., submitted.

### ■蛋白質濃度

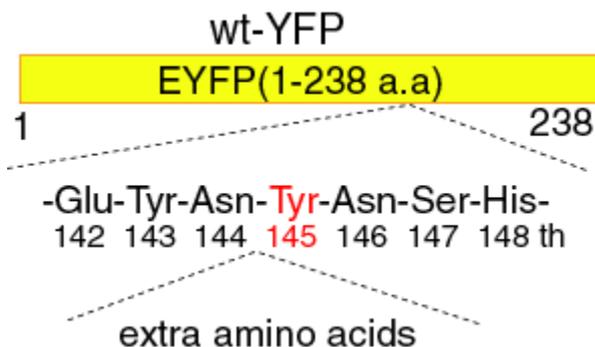


### ■細胞周期



# 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。



$\beta$ -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。

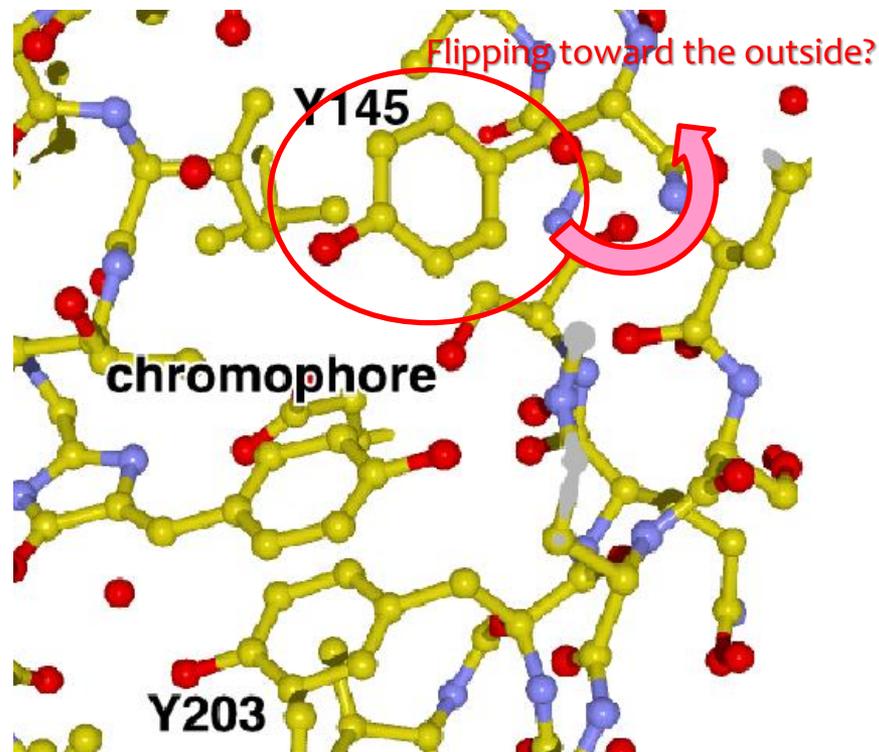


発光団付近に水分子が配置される。



水分子の状態に敏感な蛍光蛋白質。

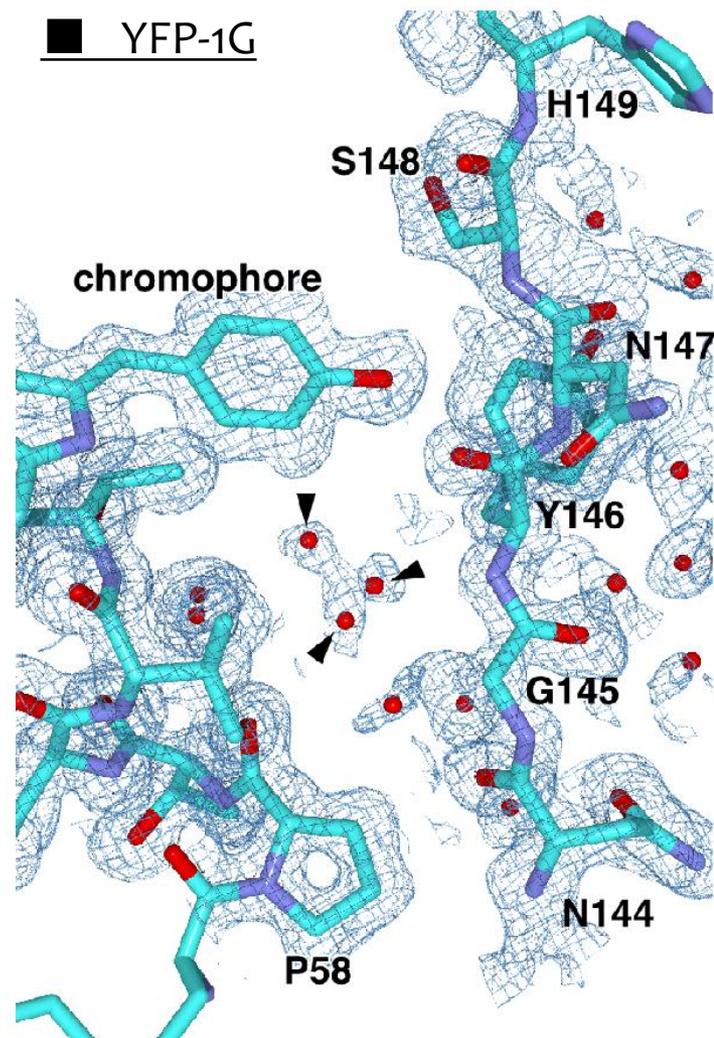
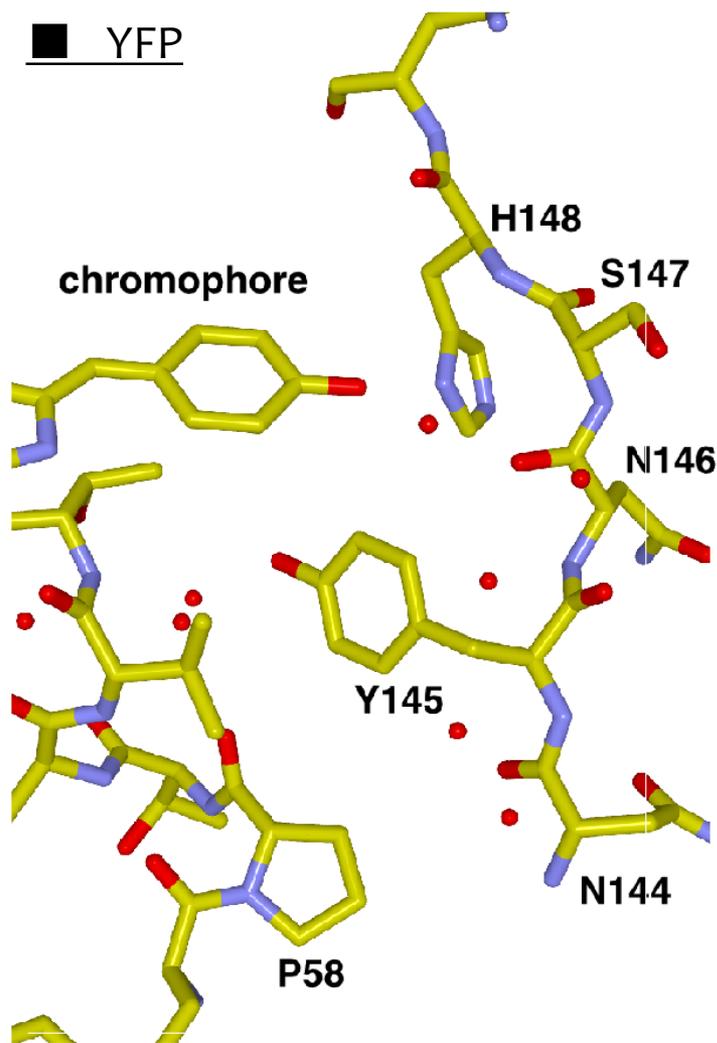
## ■ 発光団付近の構造



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。

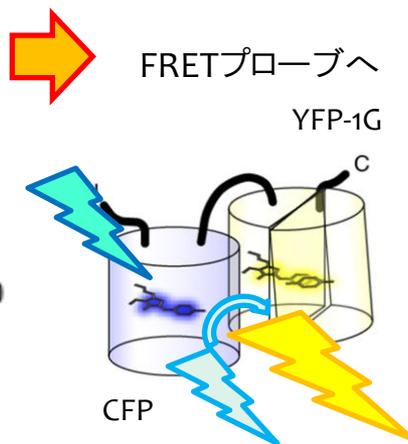
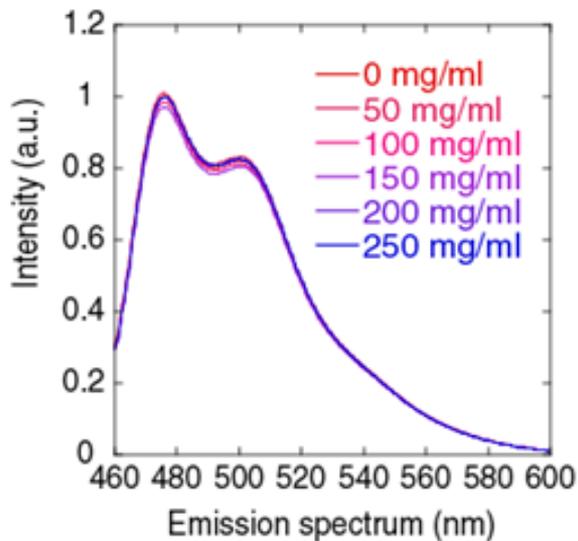
# 蛋白濃度感受性蛍光蛋白質の開発

予想通り、発光団付近に水分子が配置されていた。

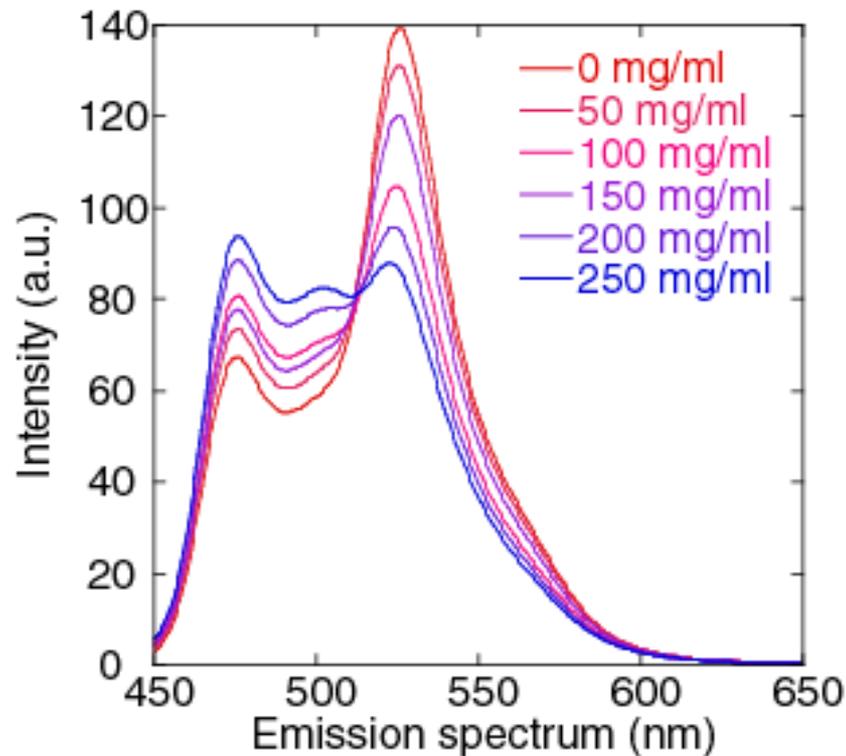


# 蛋白濃度感受性蛍光蛋白質の開発

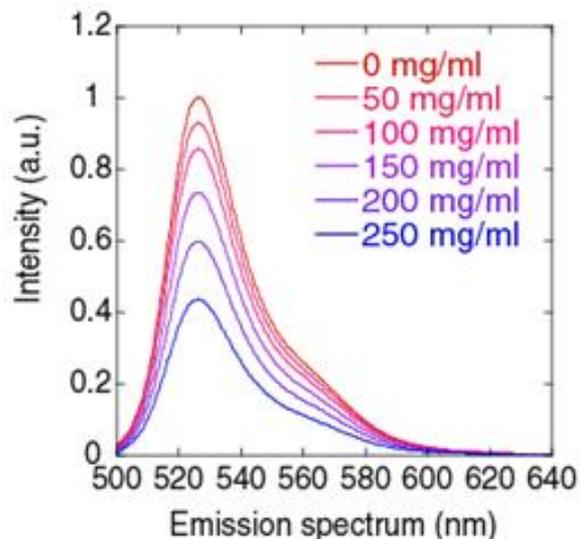
■ CFP



■ CFP-YFP-1G



■ YFP-1G



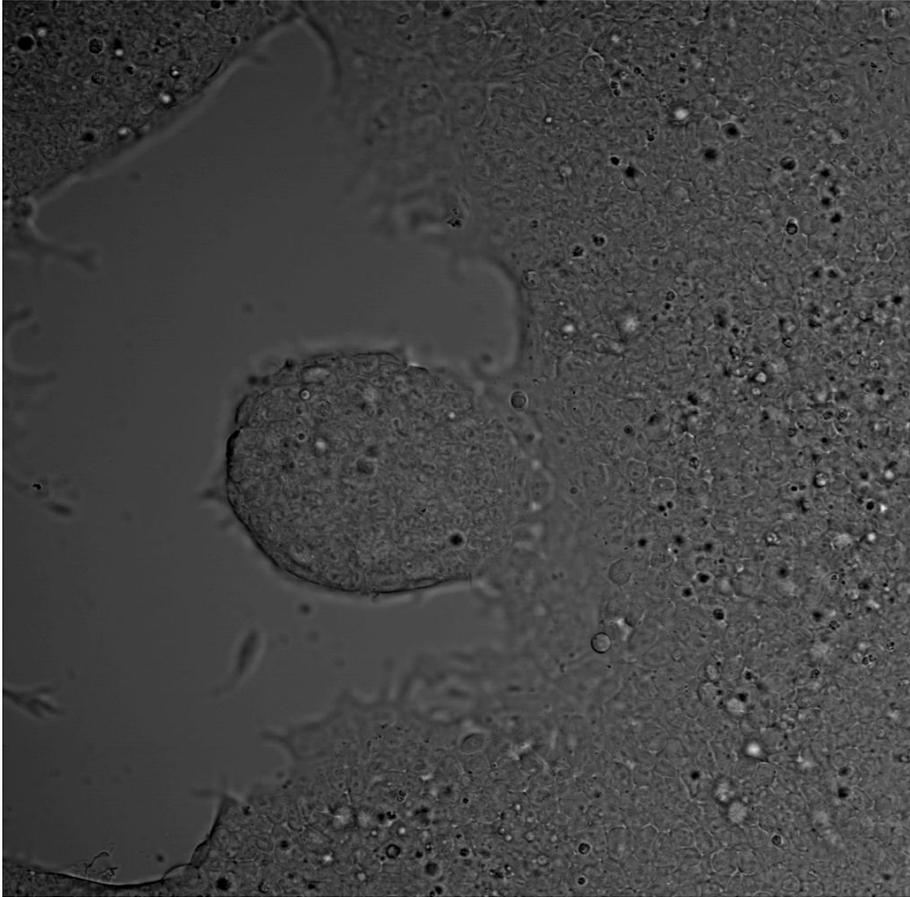
BSA濃度により波長特性が変わる蛍光蛋白質の完成。



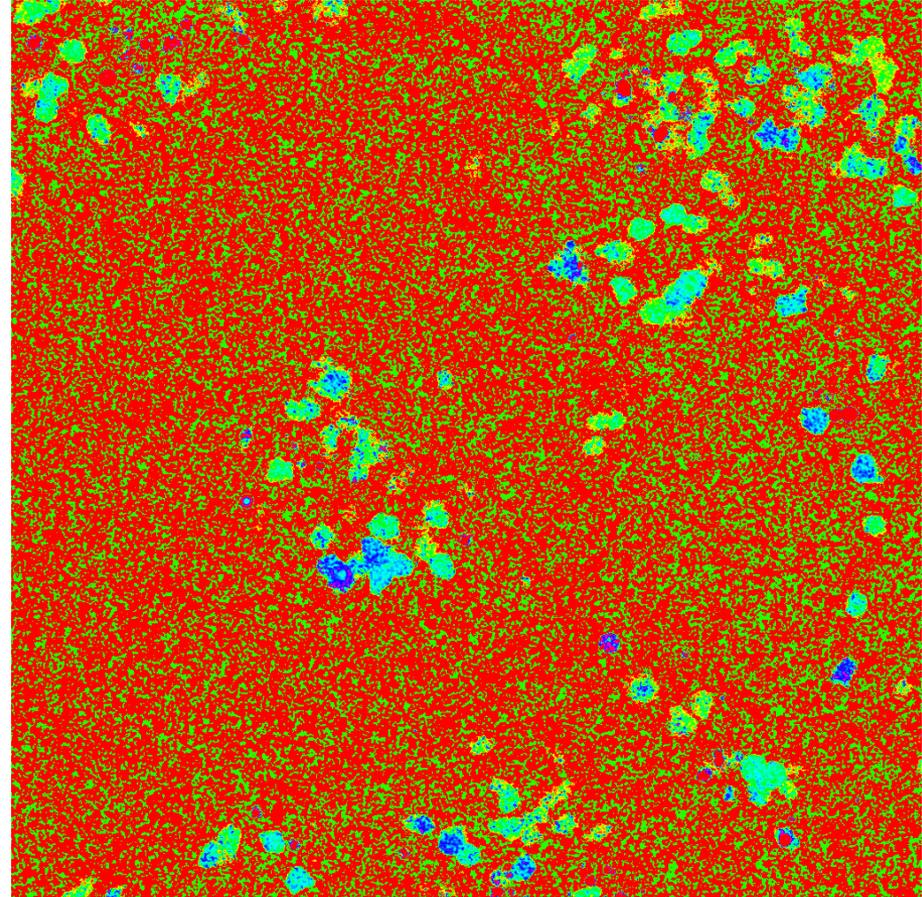
細胞分裂中の細胞内蛋白質濃度を観てみよう。

# 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

Ratio (YFP/CFP) 0.3

蛋白質濃度 High

0.5

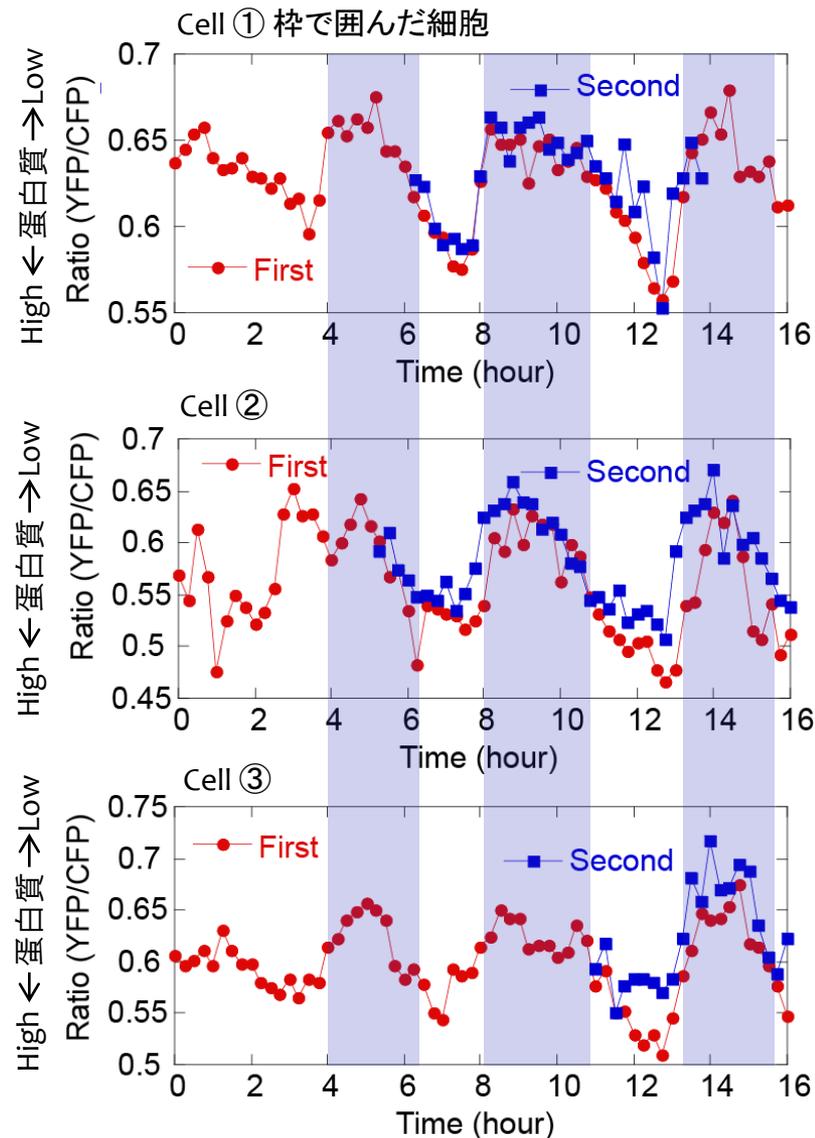
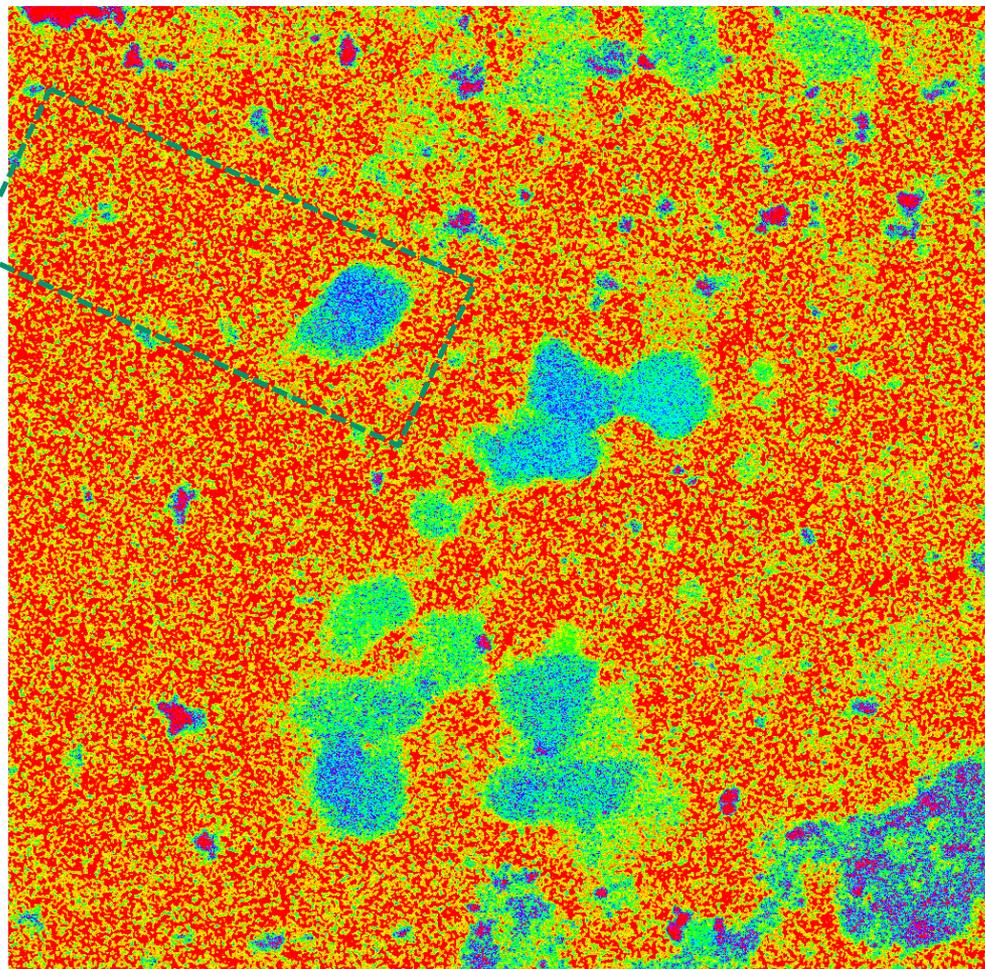
0.8

Low



# 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

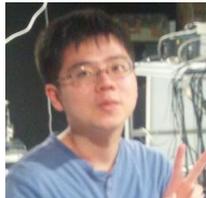
Katsumi Imada, Osaka Univ.

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

