

Development of "in vivo" multi-photon and super-resolution microscopy for elucidation of neural and secretory activities

根本知己

北大・電子研・生体物理、JST CREST

光学的な観察・測定法は「生きた」対象内部で（“*in vivo*”）、多種類の分子や細胞の動態を、同時かつ高時空間分解能で計測することが可能である。我々は、近赤外超短光パルスレーザーによる非線形光学過程である2光子励起過程を用いたレーザー走査型顕微鏡（2光子顕微鏡）を用いた“*in vivo*”生体組織イメージングの高度化を推進すると共に、その超解像化を研究している。本セミナーでは、最新の観察結果も交え、本方法論の基礎、特徴やその応用可能性について議論したい。

2光子励起過程を起こす超短光パルスレーザー光は、生体組織の分光学的な窓と言われる近赤外領域にあるため、生物個体の深部で細胞や生体分子の非侵襲的な可視化解析に有利である。我々は世界で最も深い深部到達性を有する生体用“*in vivo*”2光子顕微鏡システムの開発を行ってきた。特に、EYFPを発現するH-lineマウス成獣生体脳において、脳表面から1.4mmまでに到達することができた。即ち、大脳新皮質の全層及び白質に加え、それより深部の海馬CA1ニューロンの*in vivo*観察に成功した。また、“*in vivo*”2光子顕微鏡を用いれば、数ヶ月以上にわたって1匹の生物個体の深部で生じる変化を追跡することも可能であるため、例えば、脳梗塞後、神経回路網の再構成は機能回復期においてのみ顕著に生じることを直接的な長期観察により実証することにも成功した。さらに現在では、新しいレーザーや光技術の導入や生体試料の作成法等の改善により、海馬CA1錐体細胞の観察にも成功している。

この“*in vivo*”生体組織イメージングを、我々は脳神経科学以外の研究、特に骨組織やがんへ応用することも始めている。骨組織や結合組織においては、第2高調波発生のシグナルを用いることで無染色の組織内イメージングが可能であり、多次元的な情報を“*in vivo*”で取得することが期待されている。また、組織内の高い時空間分解能、同時多重染色性という2光子励起法の特徴は、細胞レベルでの機能可視化やその分子基盤の解析にも有効である。我々は開口放出の分子機構の解明を推進し、「逐次開口放出」という様式が存在を世界にさきがけて実証した。

一方、この同時多重染色性をさらに活用することで、我々は光の解説限界以下の微小な細胞小胞の大きさを判定する新しい方法論TEPIQ法を提案していた。これによりエキソサイトーシス・エンドサイトーシス小胞の多様性と生理機能に関する知見を得ることができた。しかし、TEPIQ法では本質的には空間分解能を向上させたものではなく、形態学的な情報は古典的な回折限界の範囲内にある。この点を解決すべく、我々は最近、新規レーザービーム「ベクトルビーム」を用いて空間解像度を改善するという新たな方法論の開発を開始した。ベクトルビームとは強度、位相、偏光が空間的分布を持っているレーザービームの総称である。その中で新たに高次径偏光ビームを共焦点レーザー顕微鏡の励起光源として用いることで、レーリーの分解能以下の微小な蛍光ビーズの一つ一つを区別して画像化することに成功した。また、2光子顕微鏡の励起光源であるTi:Sapphireレーザーを高次径偏光化することにも成功し、生物試料の観察時にも超解像化されたことを確認した。以上のように、生きたままの組織でのイメージングや超解像イメージに加えて、光刺激・操作の併用が今後、可能になれば、生体や細胞中での生理機能の分子基盤や、その破綻としての病理学的な機構の解明が加速されるであろう。

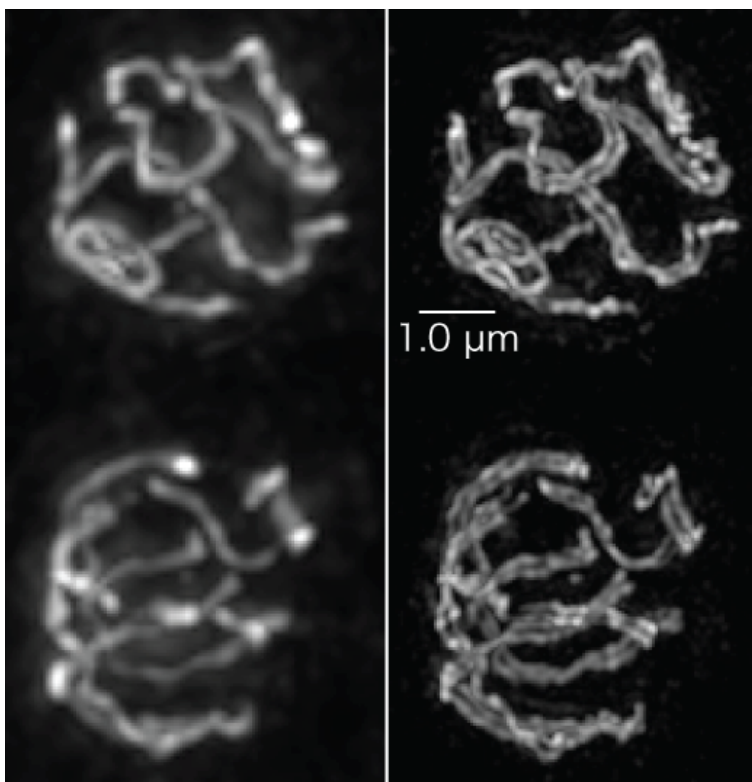
Title:

Visualizing Chromosome Structure with Three-Dimensional Structured Illumination Microscopy

Abstract:

The correct expression and inheritance of the genome is made possible in part by the cell's exquisite control and regulation of chromatin structure. While microscopy has been used to elucidate many aspects of chromatin structure, the diffraction limit of light has previously limited the amount of detail available to a resolution of ~250 nanometers. However, super-resolution microscopy techniques now allow the quantitative imaging of cellular structures at much higher detail. Three-Dimensional Structured Illumination Microscopy (3D-SIM) uses moiré interference between the sample and a striped pattern of light to increase the resolution by a factor of two. We are using 3D-SIM to analyze the fine structure of meiotic chromosomes in *C. elegans*, as well as the covalent modification of histones in pluripotent cell chromatin.

By visualizing the two lateral elements of the synaptonemal complex, separated from each other by a distance of ~150 nanometers, we can quantitatively analyze the progression of meiotic events to a finer extent than previously possible. I will discuss our use of 3D-SIM to analyze the phenotypes of meiotic mutants and to explore the function of the synaptonemal complex.



Left, lateral elements of *C. elegans* synaptonemal complexes (α -HTP-3 immunofluorescence) visualized with conventional deconvolution microscopy. Right, the same sample viewed with 3D-SIM microscopy, demonstrating the 150nm separation between lateral elements.