

平成 29 年 1 月 6 日

報道関係者各位

国立大学法人 筑波大学
愛知県がんセンター

網膜内構造の「そのまま」見える化に成功 ～新しい非線形光学顕微鏡の効果を実証～

研究成果のポイント

1. 新しい非線形光学¹⁾顕微鏡を用いて、網膜内の重要構造である「線毛根」が、標識物質なしに可視化できることがわかりました。
2. 白色レーザー²⁾という近年開発された光源を照射することで、微細な「線毛根」からの微弱信号が同定可能になりました。
3. 本技術では幅広い生物の感覚構造が可視化できることから、網膜変性疾患の診断や広範な生物感覚研究への応用が期待されます。

国立大学法人筑波大学・数理物質系の加納英明准教授と愛知県がんセンター研究所・腫瘍医化学部の猪子誠人主任研究員を中心とする共同研究グループは、新しい非線形光学顕微鏡を用いて網膜内の重要構造である「線毛根」が標識物質なしに可視化できることを証明しました。

線毛根は感覚器に顕著な線維構造で、視力・聴覚・触覚・力覚などの受容に関わることが知られています。この感覚寄与は哺乳類のみならず、ハエや線虫、繊毛虫などの微生物にも見られる機能です。またこの線維はルートレインというタンパク質が撚り合わさって(重合して)できることが知られています。

今回、高感度の白色レーザーを実装した新開発の非線形光学顕微鏡を用いることで、1ミクロン径にも満たないルートレインの重合状態が検出可能になりました。原理的には、第二高調波発生³⁾と呼ばれる非線形光学現象を利用しています。

本装置の実用価値は「標識物質なしに生体内物質を可視化すること」ですが、生命科学研究での有効性を実証するために、ルートレインの抗体染色や強制発現、遺伝子欠失処理をしたサンプルでの第二高調波観察、そして電子顕微鏡での構造相関確認等を実施しました。これにより、重合したルートレインが第二高調波の発生源となることを明らかにしました。また種々のモデル生物を使うことで、本技術が生物種に関わらず適用できることが確認できました。

今後、低侵襲化のための条件検討を進めることで、網膜変性疾患の診断や広範な生物感覚研究への応用が期待されます。

本研究の成果は、2017年1月6日(日本時間19時)付Nature姉妹誌「Scientific Reports」で公開されました。

* 本成果の一部は、文部科学省科学研究費補助金 基盤研究の研究助成のもと実施されました。

研究の背景

線毛根は感覚器に顕著な線維構造で、視力・聴覚・触覚・力覚などの感覚受容に寄与することが知られています(文献[1])。この感覚寄与は哺乳類のみならず、ハエや線虫そして織毛虫などの微生物においても保存された機能です。そのため、生きたまま線毛根が可視化できれば、ヒトでの病態評価やモデル生物での感覚機能の理解に大きく役立つと考えられますが、標識による可視化では生体本来の機能を妨害する可能性があります。

レーザー照射を用いた非線形光学顕微鏡は、標識なしに生体内物質の分布を可視化できる技術のひとつとして期待されています。その利点は、(1)電子励起を伴わないことによる光毒性効果の低減(低侵襲)、(2)後述の多重観察による解析力の向上、(3)非線形光学効果による信号強度の増大(高感度)、(4)近赤外レーザーによる生体深部観察能、(5)1ミクロン以下の高い空間分解能、等たくさんあります。しかしながら実用に資するほどの物質識別能、すなわち分子同定力を得るには、光学系の改善と、モデルとなる生命現象に適用する実証実験が必要でした。

研究内容と成果

本研究では、非線形光学顕微鏡として新たに開発した「白色レーザーを用いた多重分光顕微鏡」で、細胞の線毛根を標識物質なしに、しかも生物種に関わらず可視化できることを証明しました(まとめ図)。線毛根はルートレティンと呼ばれる蛋白質が重合した、1ミクロン径にも満たない線維状構造物です。本研究では、このルートレティンの重合状態を第二高調波発生(second harmonic generation; SHG)と呼ばれる非線形光学現象を用いて特異的に検出しました。生体組織ではこれまで、真皮のコラーゲン、筋肉組織のミオシン、神経細胞の軸索(微小管)等で SHG 信号が検出されることが知られていましたが、ルートレティンについては、その信号強度が微弱であるため検出例は報告されていませんでした。本装置で検出した線毛根からの SHG 信号の強度は、しるめ部分(コラーゲン)からのその、実に 1/1000 程度でした。

この白色レーザーの利用は、様々な光学現象の多重観察を可能にし、解析向上に寄与します(図1、文献[2])。白色レーザーの照射により発生するコヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱光(coherent anti-Stokes Raman scattering; CARS)⁴⁾は脂質や DNA を検出できることから(図 1A)、これを用いて SHG の発生源を網膜視細胞内の線維構造まで突き詰めました。また、実証実験として、線毛を赤く蛍光標識したサンプルを用いて SHG と多重観察したところ、その発生源が線毛自体ではなく根部にあることが明確に示されました。

さらに、培養細胞に対しても同様の実証実験を行い、中心体連結⁵⁾への寄与でも知られるルートレティン(文献[3])が SHG として検出できただけでなく、ルートレティン欠失細胞が示す中心体解離状態では SHG の消失が確認できました(図 2A)。ルートレティンを大量導入した細胞は電子顕微鏡で顕著な線維構造を形成し、導入しない細胞よりはるかに強い SHG が観察できました(図 2B)。以上により、重合ルートレティンを検出する SHG 特性は物質識別能の上でも有効であることがわかりました。

線毛は生物種を超えて存在する構造でもあります(文献[4])。図 3 の織毛虫の体表付近に見られる多数の SHG は同部位に存在する線毛根部を示唆しており、本技術の高い普遍性を裏付けています。

今後の展開

今後、用いるレーザーの低出力化等、低侵襲化の検討を進めることで、網膜変性疾患の診断や広範な生物感覚研究への応用が期待されます。それにより、細胞でも感じるもの、例えば力とがん化の関係なども見えてくるかもしれません。

参考図

まとめ図：白色レーザーを用いた多重分光顕微鏡で、標識なしの線毛根構造が、種を超えて可視化できることを証明した。

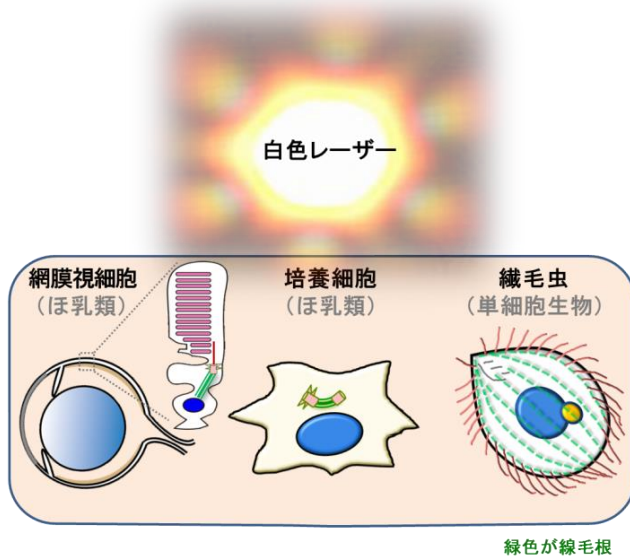


図1：網膜組織内のSHGを含む多重観察

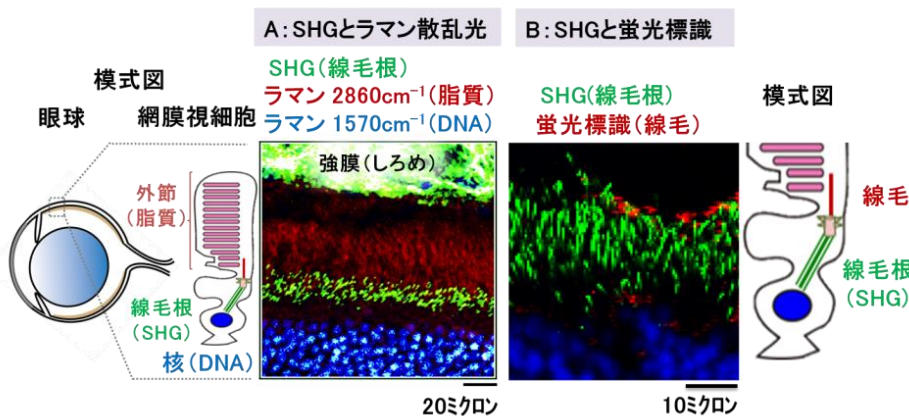


図2：培養細胞内のSHGを含む多重観察

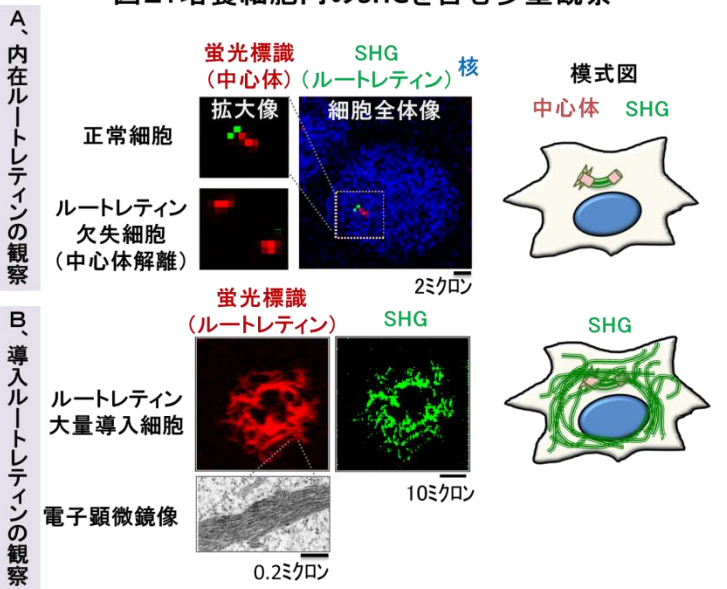
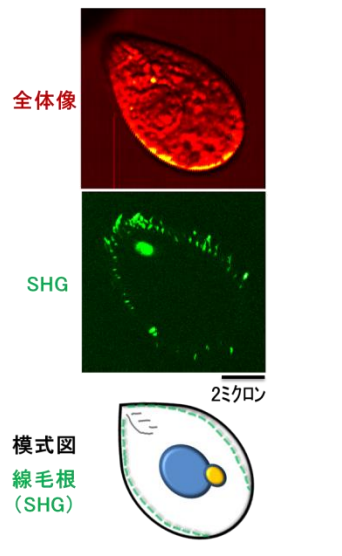


図3：繊毛虫(テトラヒメナ)のSHG観察



用語解説

注1) 非線形光学

物質に高強度の光を照射することにより発生する現象です。通常の光応答では入力光と出力光の波長が変わらないのに対し、非線形光学効果が生じると、異なる波長の信号光が発生します。

注2) 白色レーザー

紫外から近赤外域まで幅広いスペクトル成分を持ち、集光することで小さいスポットに絞ることが出来る光源です。「スーパーコンティニューム光」が正式な専門用語です。

注3) 第二高調波発生(second harmonic generation; SHG)

SHG では、信号光の波長は入射レーザーの波長の 1/2 の波長となります。今回の研究では、1064 nm の入射レーザーを用い、532 nm の SHG 信号を検出しました。

注4) コヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱(coherent anti-Stokes Raman scattering; CARS)

物質に光を照射したとき、入射光の波長から、分子振動に対応するエネルギー分だけ波長がずれた光が散乱されます。これをラマン散乱と呼びます。ラマン散乱光は微弱な光ですが、CARS はこのラマン散乱光を増幅することができます。具体的には、二色のレーザー光を分子に照射することで、照射された分子達が位相をそろえて振動します。その結果、ビーム状で、かつ明るいラマン散乱光(CARS 光)を発生させることができます。

注5) 中心体連結

中心体は通常細胞内に2つあり、ルートレティンの線維構造によって連結されています。この線維構造は、細胞分裂時に中心体が紡錘体極として解離する際には無くなります。

参考文献

- [1] Chen, J. V. et al. Rootletin organizes the ciliary rootlet to achieve neuron sensory function in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 211, 435–453 (2015).
- [2] 加納英明, オプトロニクス 35, 54 (2016).
- [3] Bahe, S., Stierhof, Y. D., Wilkinson, C. J., Leiss, F. & Nigg, E. A. Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *J. Cell Biol.* 171, 27–33 (2005).
- [4] 猪子誠人, 稲垣昌樹. 一次線毛動態による新たな細胞増殖制御機構 ～ トリコプレインーオーロラ A キナーゼ経路～. *化学と生物(日本農芸化学学会誌)* Vol.51, No.8, pp524–533 (2013).

掲載論文

- 【題名】 SHG-specificity of cellular Rootletin filaments enables naïve imaging with universal conservation (細胞内ルートレティン線維が示す特異的の二次高調波発生は生物種を超えた非標識可視化を実現する)
- 【著者名】 Toshihiro Akiyama, Akihito Inoko*, Yuichi Kaji, Shigenobu Yonemura, Kisa Kakiguchi, Hiroki Segawa, Kei Ishitsuka, Masaki Yoshida, Osamu Numata, Philippe Leproux, Vincent Couderc, Tetsuro Oshika, Hideaki Kano*
* 共同責任著者
- 【掲載誌】 *Scientific Reports*

問合わせ先

<顕微鏡に関する事>

加納英明(かのう ひであき)

筑波大学 数理物質系 物理工学域 准教授

<http://bukko.bk.tsukuba.ac.jp/~CARS/>

<生物学に関する事>

猪子 誠人(いのこ あきひと)

愛知県がんセンター研究所

腫瘍医化学部 主任研究員