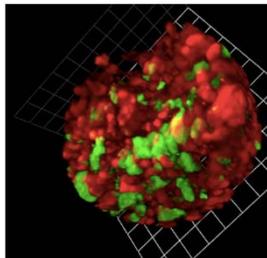




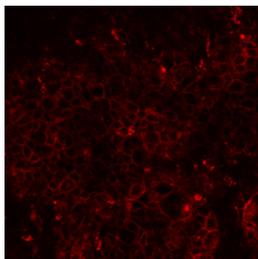
主に西日本地区における生体深部観察支援を行います。具体的には、多光子励起顕微鏡を用いて、生きているモデルマウスの脳やがん組織などさまざまな組織や疾患を対象に、リアルタイムイメージングや三次元画像構築を支援します。そのために独自で開発した長波長・補償光学対応の多光子励起顕微鏡を3台完備しています。さらに、生体用共焦点レーザー顕微鏡と共焦点レーザー・マクロズーム一体型顕微鏡、超解像顕微鏡(SIM)や光シート顕微鏡を用いた生体観察にも対応可能です。



骨転移モデルマウスにおける、骨髄内の乳がん細胞の細胞周期イメージング(赤:G1期、緑:S/G2/M期)



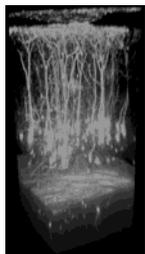
長波長・補償光学対応多光子励起顕微鏡(1号機)、動物実験室内にあり、長期間の継続的観察が可能。



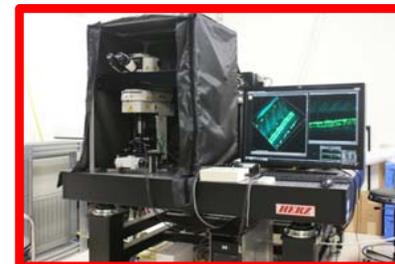
皮下移植モデルマウスに、蛍光標識した抗CEA抗体を投与後に、多光子励起顕微鏡で生体がん細胞イメージングを行った。



長波長対応多光子励起顕微鏡(2号機)

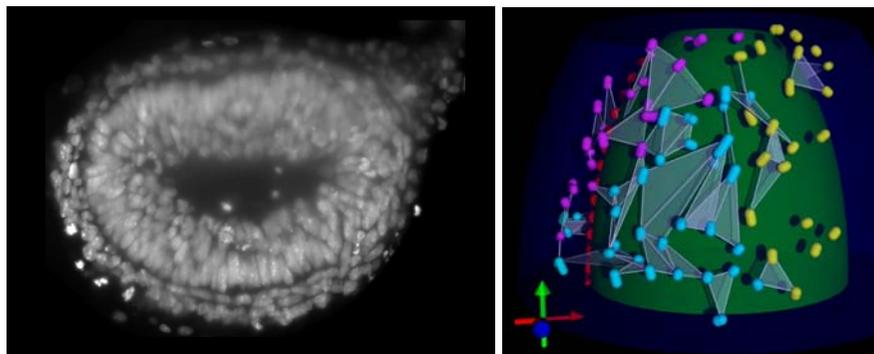


長波長対応多光子励起顕微鏡を用いたH-lineマウスの生体脳の3Dイメージング。大脳新皮質の錐体細胞のみならず海馬の細胞もイメージングされている。

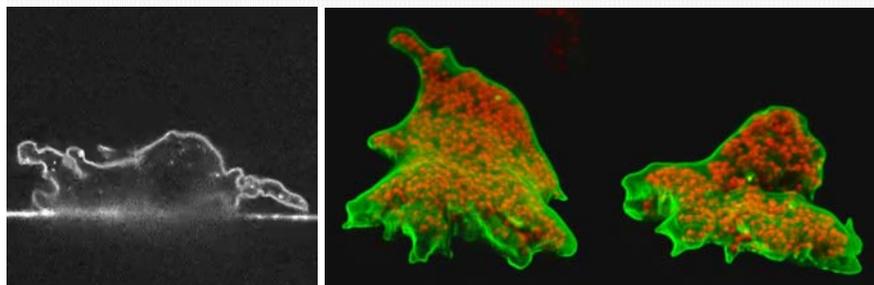


補償光学対応多光子励起顕微鏡(3号機)

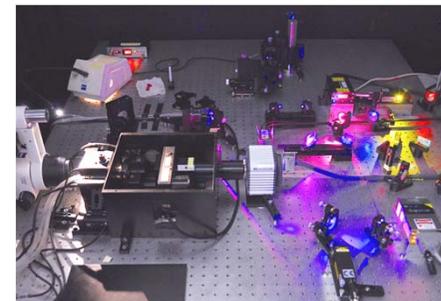
生体試料を3次元的に観察する新たな顕微鏡法として近年利用が広がりつつある光シート顕微鏡支援します。本顕微鏡は褪色や光毒性が圧倒的に少なく、かつ広い視野を高速に観察できる点が特徴であり、組織～胚～個体のライブ観察、透明化した巨大試料の観察等に特に威力を発揮します。一方で試料の保持方法や得られる画像に独特のクセがあること、共通機器としてまだあまり普及していないことが利用のハードルになっています。本技術支援では、これまでも共同研究として様々な種類の試料を扱ってきた担当者が、観察方法の選択、実際の試料の調製と撮影、得られた画像データの可視化までを支援します。



原腸陥入期マウス胚の4D観察と中胚葉細胞移動の追跡(左:生画像、右:解析結果)

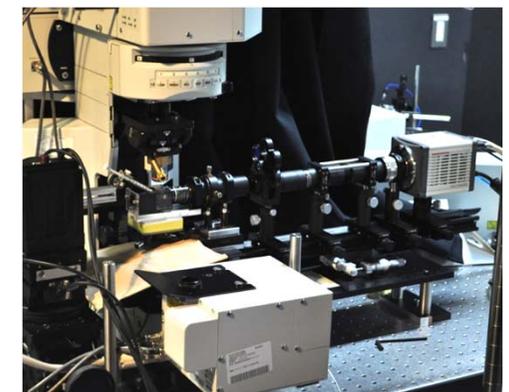


自由運動するアメーバの高速4D撮影



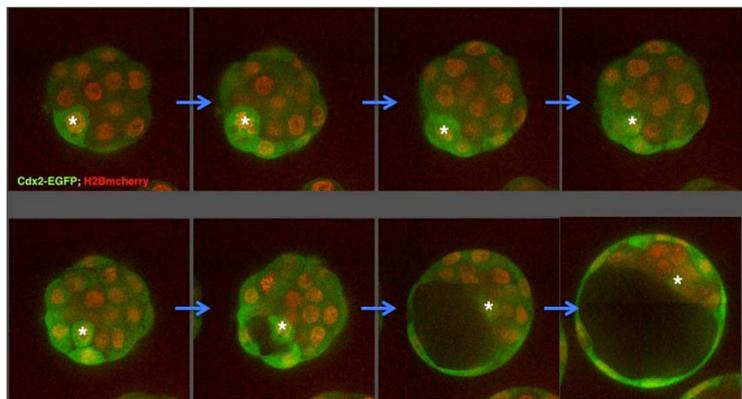
マルチビュー撮影やタイリング撮影可能な、デジタルスキャン光シート顕微鏡 DSLM。

既存の共焦点顕微鏡を元に構築した光シート顕微鏡ez-DSL。非常に高速、かつ自作機であるため様々な種類の実験に柔軟に対応可能。

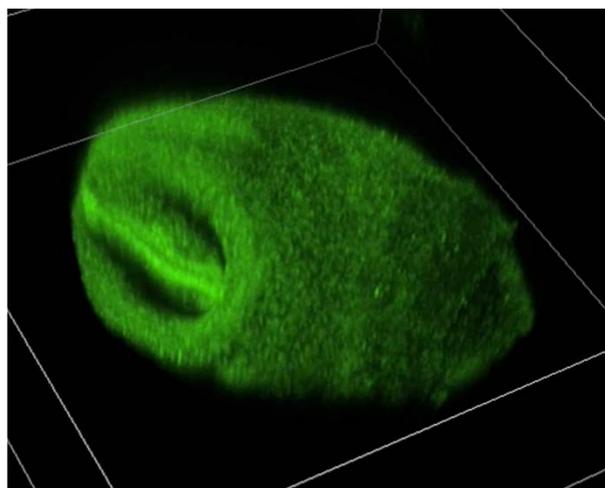
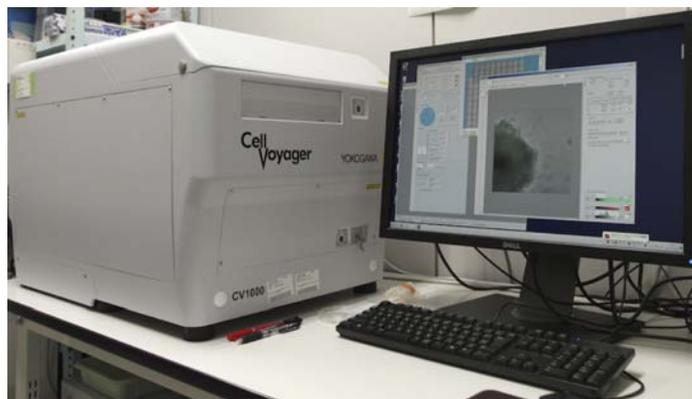


ユーザーインターフェースに優れた市販の光シート顕微鏡を導入、支援事業に供する予定。

インキュベーター設置型スピニングディスク顕微鏡、2光子顕微鏡などを用いて数日間に至る長時間のタイムラプス観察技術支援を行う。細胞、器官、組織に加え、生体イメージングにも対応するため、研究所内で維持している各種のレポーターマウス利用、試料の準備、培養条件および撮影条件の設定、実際の撮影までの技術支援を行う。



胚を生かしたまま細胞の挙動の連続観察

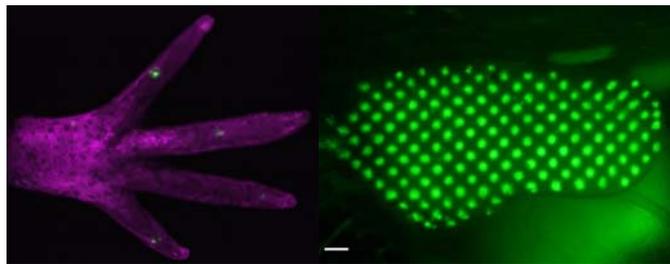


マウス胚の立体タイムラプス観察

利用する設備：

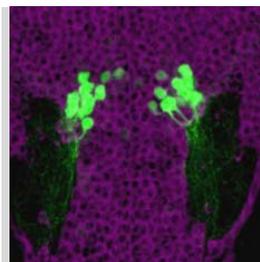
- インキュベーター設置型スピニングディスク顕微鏡 3台
- 2光子顕微鏡 (倒立、ファイバーレーザー、1045nm、インキュベーター付き)
- 2光子顕微鏡 (正立、倒立顕微鏡、1300nmまでの励起可) など

熱ショック応答を利用して生体内の単一細胞や局所に赤外レーザー光を照射・加熱して目的遺伝子の発現誘導を行うことができる顕微鏡(IR-LEGO)の利用を支援します。対象生物はトランスジェニック系統を作成できる生物種です。メダカ・ゼブラフィッシュ・線虫・ショウジョウバエ・ツメガエルなどのモデル動物からイベリアトゲイモリと言った新規モデル動物、シロイヌナズナ・ゼニゴケなどのモデル植物でも応用されています。単一細胞標識による系譜解析、発生・再生に関連する遺伝子の異所性発現による機能解析などに応用できます。また、生物の温度応答を局所で行うことで見える現象に対する研究も行われています。分子生物学・顕微鏡光学を応用して作られた本顕微鏡技術開発した研究者が、実験計画の立案から実施まで支援します。



様々な生物種(左:イベリアトゲイモリの前肢、右:アフリカツメガエルの後肢発生期)におけるIR-LEGOを用いた局所的な遺伝子発現実験の例(それぞれGFPを発現誘導)。細胞の標識や細胞系譜解析に使用できる。

(Kawasumi-Kita, A., Hayashi, T. et al. *Dev. Growth Differ.* 2015)

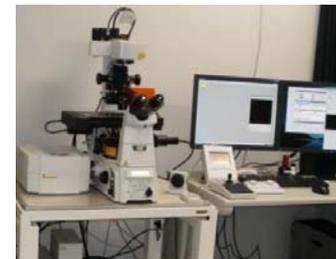


他の先端顕微鏡によるサポートも実施します。左図はメダカ脳切片の神経細胞(avt-GFP)とホルモン(AVT)の分布。Leica TCS SP8 MPによる画像取得で、詳細な神経細胞の投射観察が可能である。

(Kagawa, N. et al. *Neurosci. Lett.* 2016)



1480nmの赤外線レーザー(1w)を生体内の単一細胞に照射するシグマ光機製IR-LEGO 1000顕微鏡システム。赤外線透過率の高いカスタムメイド対物を搭載。



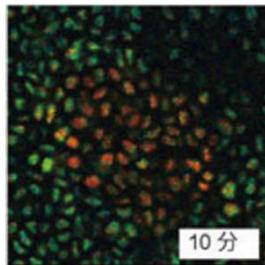
共焦点レーザー顕微鏡システムニコンA1R。レゾナントスキャナー搭載で、高速3次元画像取得が可能。IR-LEGOで誘導後の蛍光観察に利用できる。



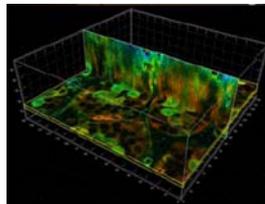
2光子励起用波長可変レーザー Insight DeepSeeを搭載したLeica TCS SP8 MP多光子励起レーザー顕微鏡。こちらもIR-LEGOで誘導後の蛍光観察に利用できる。



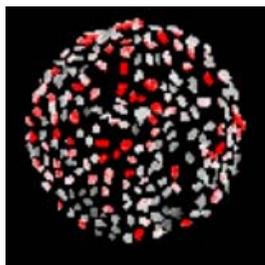
培養細胞～小動物の蛍光ライブイメージングを支援します。特に蛍光タンパク質やバイオセンサーを発現したマウスや三次元培養細胞の長時間イメージングを得意とします。多光子顕微鏡には、吸引型臓器固定器、焦点追尾ソフト、麻酔器、心電計が付属しており、数時間にわたるマウスの観察ができます。培養器型多光子顕微鏡は、3次元培養細胞・組織を数日間にわたり安定して観察できます。多光子蛍光寿命顕微鏡は蛍光共鳴エネルギー移動を定量的に測定し、タンパク質間相互作用を画像化します。専任の技術員が観察を手伝いますので、初めての方でも安心して利用できます。



細胞の増殖や分化に関わるERKというタンパク質の酵素活性が表皮細胞間で同心円状に広がる現象 (SPREAD)を発見、さらにその現象が細胞周期のG2期からM期と呼ばれる後半部分の進行に与することを明らかにしました。本研究成果は、科学雑誌「eLife」に掲載されました(10.7554/eLife.05178)。



白血球の運動や炎症反応を制御する細胞外シグナル制御キナーゼとプロテインキナーゼAというタンパク質の酵素活性を生きたマウスの白血球で観察することに世界で初めて成功しました。さらにこのマウスを使って、インドメサシンなどの非ステロイド性抗炎症薬が白血球を活性化させ、炎症を憎悪させることを見出しました。この研究は米国科学雑誌「Journal of Experimental Medicine」誌に発表されました(10.1084/jem.20132112)。



Ras-ERK情報伝達系におけるERK分子活性と細胞増殖の関係を1つの細胞内で調べるために、ラット正常腎臓細胞NRK-52E細胞にERKのFRETバイオセンサーEKAREV-nlsを発現させ、サイトグラフ上で培養し、長時間FRETイメージングを行いました。ERKが確率的に活性化し、隣の細胞へのERK活性化が伝播することが明らかになりました。本研究は「Molecular Cell」誌に発表されました(10.1016/j.molcel.2013.09.015)。



近赤外線パルスレーザーによる励起レーザーシステムInsight DeepSeeを用いた多光子励起レーザー顕微鏡Olympus FV1200MPEは、深部をより明るく、解像度よく、かつ光ダメージを抑えた生体イメージングを可能とします。新標本透明化技術に対応した専用の対物レンズも備えており、最大8mmの解像力の高い三次元画像を撮像することも可能です。



インキュベータ型多光子励起レーザー顕微鏡Olympus LCV-MPEは、光ダメージを抑えつつ、三次元培養細胞や、ES細胞、さらにはマウス胚組織を数日にわたり観察をするために開発されたもので、これら三次元培養、器官培養、胚発生の研究等に威力を発揮します。



多光子励起レーザー顕微鏡では、麻酔下のマウスを用いて様々なバイオセンサーを発現する細胞の動態や局在を観察できるintravital imagingを得意としており、生体内で起こっている現象をそのまま可視化することができます。これらマウスを経時的に観察するための小動物室を整備しています。

近年、光学顕微鏡技術の進歩により様々な生命現象を直接観察することが可能となってきました。2光子顕微鏡は生きた動物の組織観察に最適な顕微鏡であり、脳内の細胞だけでなく生体内の様々な領域の細胞構造も観察可能です。一方で、2光子顕微鏡が高額であること、また、この顕微鏡を用いたin vivoイメージング法及びその解析法は高度な技術を要する手法であるため、2光子顕微鏡を用いた生体イメージングへの参入が難しい原因となっています。そこで、本技術支援では、2光子イメージングの経験者が生体イメージングの技術支援を行い、最先端の技術を全国の研究者に提供することを目的としています。

3つの特徴

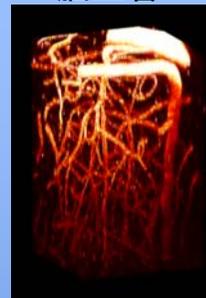
1. 生きた動物の体内組織の可視化、及び摘出組織、培養細胞などin vitro標本を用いたイメージング
2. 生体内の様々な細胞の可視化(神経、グリア細胞、血管、腸管、免疫細胞など)
3. 同一個体の同一構造物の長期観察(例:同一シナプスの2ヶ月にわたる長期観察)

2光子顕微鏡

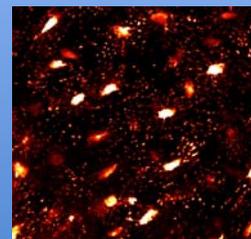


生体内構造の観察

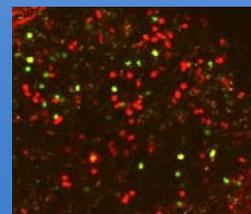
脳血管



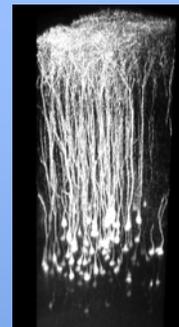
骨細胞



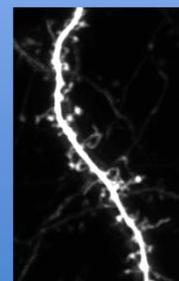
免疫細胞



脳神経



シナプス



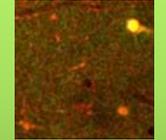
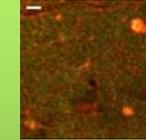
光刺激による操作

アストロサイト

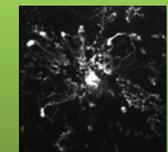
血管NOアンケー
ジ
ング



Ca²⁺アンケー
ジ
ング
刺激前 刺激後

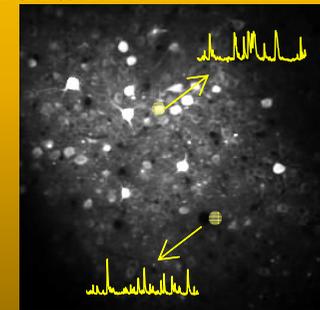


ミクログリア
レーザー障害

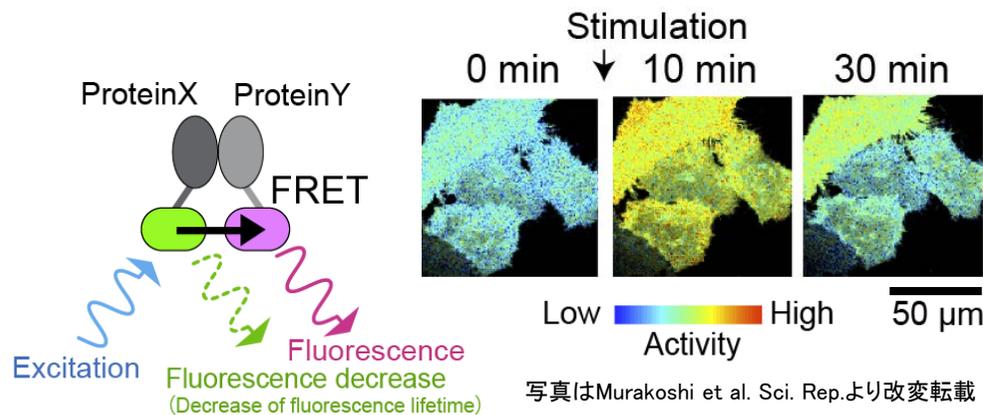


細胞活動観察

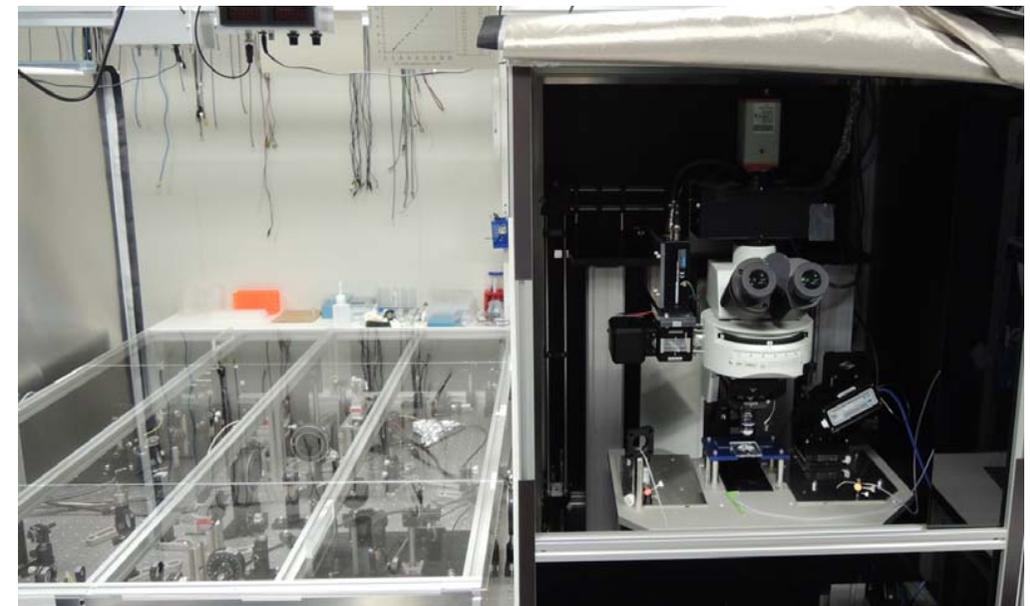
カルシウムイメージングによる
神経活動計測



2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡によるFRETイメージング支援を行う。被支援者が作製したプローブ(事前に詳細を相談)を遺伝子導入し、培養細胞や組織内で分子の会合状態や局在を観察することができる。また、Ras/RhoA/Rac/Cdc42/CaMKIIの活性化プローブについてはこちらで準備しているため、すぐに観察を行うことができる。免疫沈降等では得られない細胞内分子の時空間情報を比較的簡便に得ることができるのが本手法の特徴である。



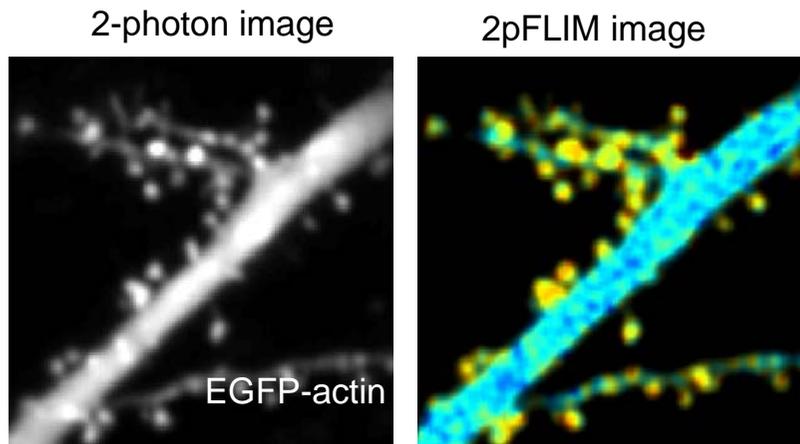
培養細胞内分子活性化イメージング



利用する設備：

2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡2台

2台のTi:Saレーザーにより、イメージングと光刺激を同時に行うことができる。利用できる波長は720~1000 nm.



脳組織神経細胞内分子活性化イメージング



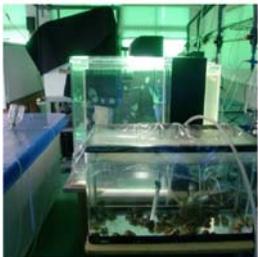
海産生物は生命の源であり、そのイメージングの成功は新たな生命原理の解明につながります。しかし海産生物には採集、飼育維持、調製など、ライフサイエンスに用いられるモデル生物にはない困難が伴います。本支援では、海産生物の生殖や発生、行動、生態など多岐にわたる海産生物生理に重要な細胞運動(特に高速運動)の光学顕微鏡観察とイメージングの支援を行います。研究室が臨海施設にある利点を生かし、研究材料の飼育・ハンドリングから生物試料の調製を含めた、海産生物のイメージングを全般的に支援します。具体的には繊毛の高速運動記録と解析、精子・遊走子・幼生・原生生物・プランクトンの行動解析とカルシウムなどのイメージング、細胞骨格解析などが主な内容ですが、それ以外の内容でも相談に応じます。



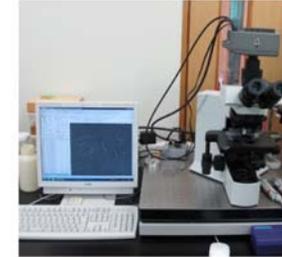
海洋調査船、潜水、磯採集などさまざまな採集方法を駆使して、研究材料である海産生物を採集します。大型生物は屋外水槽にて維持します。



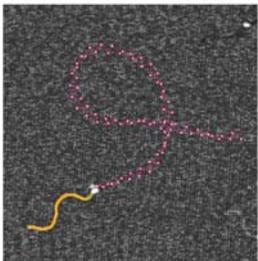
海産生物の行動軌跡を記録し、速度や曲率などを定量的に解析します。パラメータ設定などを工夫し、多様な生物、行動パターンに対応します。



生物の長期飼育に必要な恒温屋内循環水槽も完備しています。幼生の飼育など、食餌と維持に関するノウハウもあります。



高速に運動する繊毛の振動や波形パターンを高速カメラで記録し、解析ソフトウェアで定量解析します。



当研究室では繊毛の高速運動解析を基本に、精子・遊走子・微細藻類・原生生物・動物幼生などのカルシウムイメージングや行動・進化を研究しています。



カルシウムなどの細胞内シグナル分子の挙動をLEDストロボ照射により可視化します。多様な分子に対応すべく、システムに改良を重ねています。



名古屋大学ライブイメージングセンター (<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/liveimagingcenter/index.html>)では、被写体は動植物を問いません。また、個体を対象とする広視野観察から超解像観察まで幅広く対応するオープンな最先端施設です。ライブイメージングや顕微操作を得意とし、チーフコーディネーターによるサポートなど、ユーザーの成果につながる運営を心がけます。



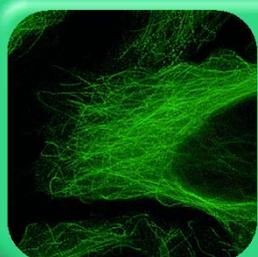
植物深部イメージング

InSight DeepSee (Spectra Physics)を搭載した正立型二光子顕微鏡(TCS-SP8; Leica)、倒立型二光子顕微鏡(LSM780-NLO-DO; Zeiss)による深部観察ができます。また、ライトシート顕微鏡(Lightsheet Z1.; Zeiss)を用いた広視野観察により比較的大きな試料(数mm)を丸ごと観察できます。



多検体高速イメージング

96穴プレートを利用してハイスループット観察ができます。



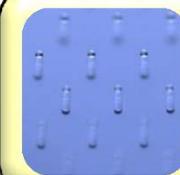
超解像イメージング

STEDレーザー(592 nm)を搭載したSTED顕微鏡(TCS-SP8 gSTED; Leica)により超解像観察ができます。また、470-670nm 範囲で任意の波長で励起できるホワイトライトレーザーとGaAsPハイブリット検出器を搭載していることも特徴の一つです。



λ イメージング

近接した蛍光波長をもつ色素を分離できます。



μ 流体デバイス

光リソグラフィ技術によるマイクロ流路を活用できます。



顕微操作

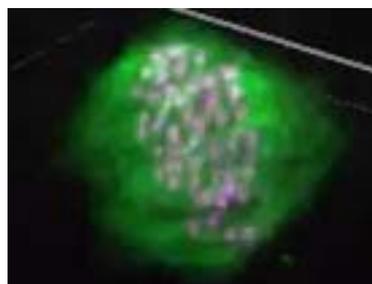
支援担当者が開発した植物細胞用マイクロインジェクション装置(LTM1000; Nepagene)、マイクロダイセクション・光ピンセットシステム(PALM Combi system; Zeiss)、光遺伝子発現誘導装置(IR-LEGO; Olympus)などをご利用いただけます。



合成蛍光プローブ

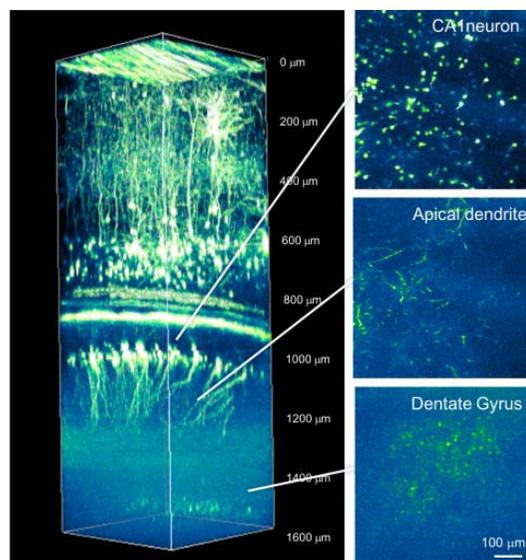
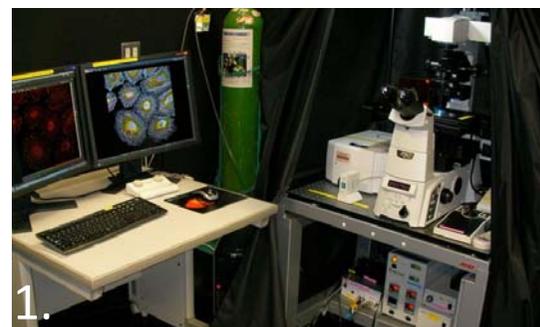
ITbMで開発した蛍光分子プローブを活用できます。

北海道大学ニコンイメージングセンターは、常駐教職員が機器操作から解析までの一連の指導を行うことで、光学顕微鏡関連の技術支援を行っております。設備の中でも、スピニングディスク2光子顕微鏡を共用設備として保有しているのは、世界でも唯一です。本顕微鏡は、CSUの高速性、低侵襲性という特性をそのままに、励起光として近赤外パルスレーザーを導入することで、深部観察も可能とした顕微鏡で、本センターにて開発が行われました。他にも、超高速画像取得や分光イメージングが可能な共焦点顕微鏡、2光子顕微鏡、多色・多点の時間変化観察が可能な蛍光顕微鏡、各種解析ソフトウェアなどの多様な設備を有しています。



植物細胞の細胞分裂の過程を、スピニングディスク2光子顕微鏡で観察。2チャンネル・数十枚の画像を1分間隔で取得し、3次元モデルの構築が可能。

サンプル提供:
基礎生物学研究所 村田隆准教授



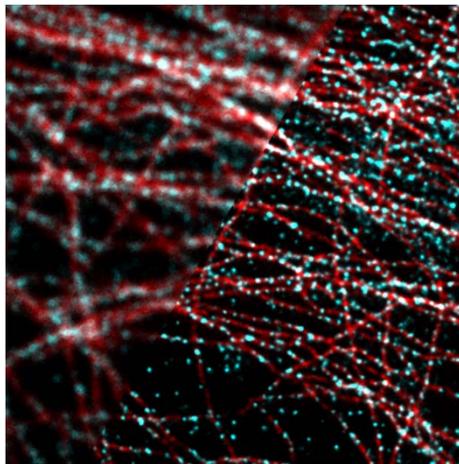
マウス脳深部の2光子顕微鏡による *in vivo* イメージング (R. Kawakami et al., Sci. Rep. 2103, Biomed. Opt. Express 2015)。

新皮質全層のみならず、海馬CA1や海馬歯状回ニューロンなど、深さ1000μmより深い部分も観察。

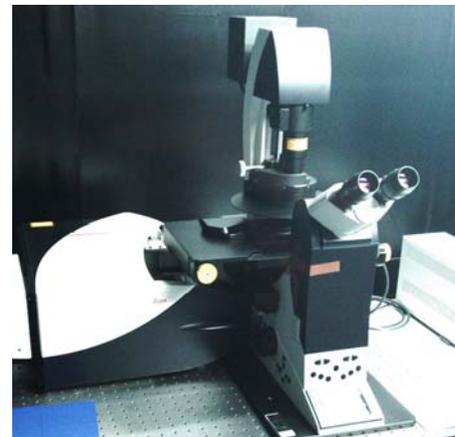
利用可能な設備:

- Station-1: 共焦点顕微鏡 (Nikon A1R, 写真1)
- Station-2: 全反射蛍光顕微鏡 (TIRF)
- Station-3: 多色蛍光タイムラプス顕微鏡
- Station-4: リアルタイム共焦点顕微鏡
- Station-5: スピニングディスク2光子顕微鏡 (Yokogawa CSU-MP, 写真2)
- 2光子顕微鏡 (Nikon A1R-MP, 写真3)

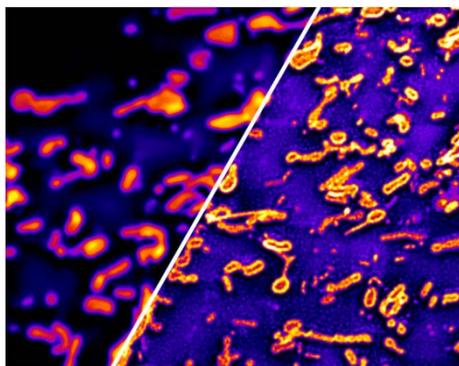
誘導放出制御顕微鏡(STED)、スピニングディスク超解像顕微鏡(SDSRM)、蛍光分子局在化法(PALM/STORM/GSDIM)など、各種超解像顕微鏡法について、手法の選択・試料調製から観察・画像取得までを包括的に支援できる体制を整える予定です。



2重染色の作例
微小管(赤)
MAP4(シアン)
左側は共焦点画像
右側はSTED画像



STED顕微鏡
Leica SP8-STED3X
励起用にWLL(白色パルスレーザー)、
Depletion用に592nm, 660nmが
搭載されています。

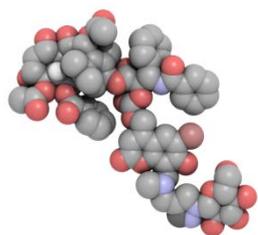


SDSRMの作例
ミトコンドリア外膜
(TOMM20-Emerald)
左側は通常像
右側はSDSRM画像

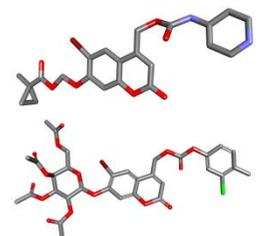


スピニングディスク超解像顕微鏡
(SDSRM)
横河CSUベースの市販機とは異なり、
当研究室でオリンパスと共同開発
したDSUベースのオリジナルです。

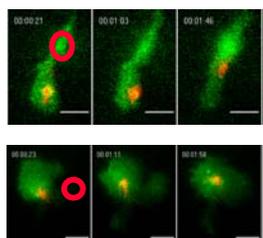
有機合成化学, および, 光化学の知識と技術に基づく光機能性プローブ作成, 光化学的および光物理学的性質の検証支援を行う。各種低分子量ケージド化合物およびその他の光機能性プローブの合成, 近赤外フェムト秒パルスレーザーを利用する光作動性分子の2光子励起反応効率評価法の相談および技術支援, および, 紫外・可視光領域光源を用いる1光子励起光反応効率測定のための技術支援を行う。



高い水溶性と光反応性を有するモジュール型ケージドパクリタキセルの構造



細胞種選択的に光感受性を獲得するケージド化合物の構造



ケージド化合物を加えた細胞(上)の局所光刺激で, 細胞内シグナル伝達を時空間的に制御する



各種検出器付き分析用HPLC, 複数台の分取クロマトグラフ装置, プローブ合成と光化学的性質の測定



近赤外フェムト秒パルスレーザーを利用する2光子励起効率測定用セットアップ



紫外・可視領域光刺激倒立型蛍光顕微鏡。ケージド化合物の光化学的性質測定