

公益財団法人 川西記念新明和教育財団

2022 年度 研究助成成果報告書

細胞集団の革新的な観測環境の構築

-超高速 3次元精密観測と生存条件の自在な制御-

Establishment of Innovative Observation Environment for Cell Populations Ultrafast 3D

precision observation and flexible control of survival conditions

研究代表者 甲南大学 岡畑 美咲

1. 研究背景

生物はさまざまな環境情報を感覚ニューロンで受容し、複数の情報を適切に処理することで体を健康に保っている。これまでに、神経系のモデル動物である線虫 *C.*

elegans を用いて、複数の環境情報を統合・

区別する神経回路モデルを提唱した。具体的には、環境の酸素濃度が温度応答性に影響

を与える神経回路モデルを同定した(Okahata et al., *Science Advances*, 2019) (図 1)。一

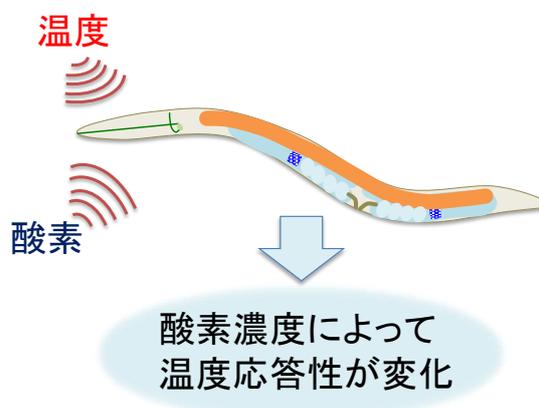


図 1. 酸素と温度を統合・区別する神経回路

方で、これまでの顕微鏡装置では、酸素や温度などの複数の生存条件を制御しながら、動き回る細胞活動を 1 細胞レベルで計測することはできなかった。生物は観察対象として非常に複雑であることから、このような装置を開発するためには、生命科学の研究者が実際に生物の観察をしながら、顕微鏡の開発を行う必要がある。そこで、本研究では、温度・酸素濃度といった生物が生存するために重要な環境情報を制御しつつ、最新の光学装置と画像解析ソフトウェアを用いて 1 細胞レベルの観察を行うための顕微鏡装置の開発を行うに至った。

高速で動く細胞を様々な生存条件で観察することが可能になれば、生物学・医学の研究に役立つと考えられる。例えば、温度は精子の受精率に影響を与えることが知られており、さらに酸素濃度の変化によって生じる細胞内の活性酸素が精子形成の維持に影響を与えることが知られている (Morimoto et al., *Genes and Development*, 2021)。このように、酸素と温度を制御しつつ、細胞を高速で追尾する顕微鏡システムは、生物学分野だけでなく、人工授精における活発な精子の絞り込みや、運動中の神経活動の測定など、微細な多数の動的物質を扱う医療分野の発展に大きく寄与できると考えられる。

2. 研究の目的

これまでに、酸素情報が温度応答性に影響を与える神経回路とそこでの細胞挙動を同定したが (Okahata et al., *Science Advances*, 2019)、従来の観察方法では、酸素と温度などの複

数の生存条件を管理しつつ、自由に動き回る細胞を観測することが困難であった。そこで本研究では、最新の光学技術と画像解析技術により、自由に運動している細胞集団を超高速でとらえ、細胞活動を1細胞レベルで計測すること、および、温度・酸素濃度といった細胞集団の生存条件を自在に制御することを目指す（図2）。

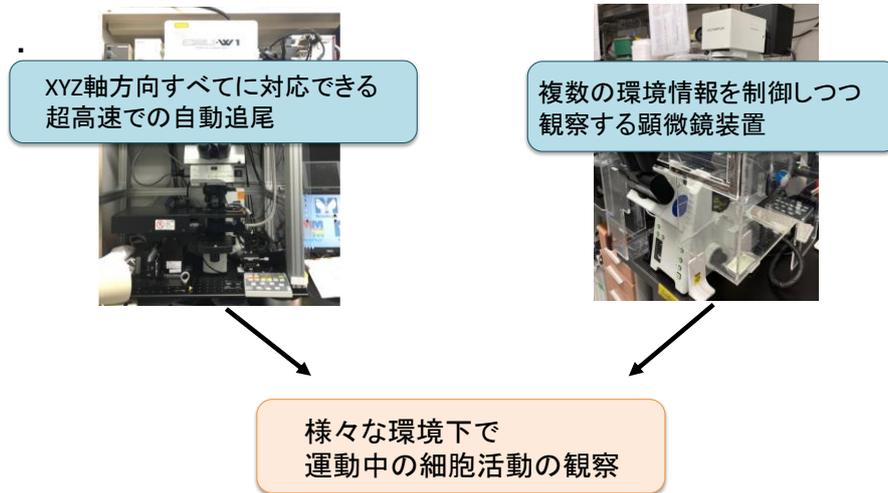


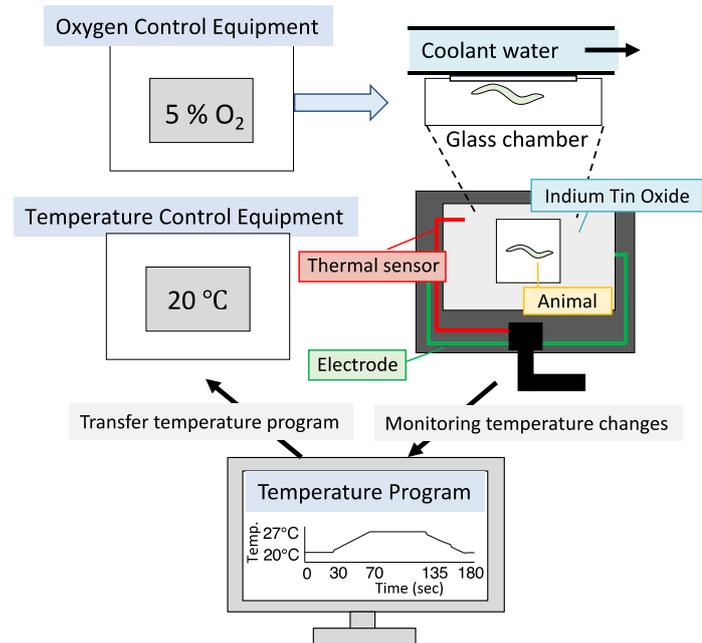
図2. 環境情報を制御しつつ動的細胞を追尾する顕微鏡システムの構築

3. 研究方法

酸素濃度と温度を制御する顕微鏡

システムの構築

東海ヒット社、エビデント社と
共同で温度と酸素を同時に制御し
ながら細胞を観察する顕微鏡装置
の開発を行った。エビデント（旧オ



リンパス) IX81 倒立顕微鏡に東海ヒット社の酸素制御装置と温度制御装置を取り付け、

酸素濃度を一定に保ちつつ、目的の

図3. 酸素と温度を制御する顕微鏡システム

温度変化を正確に制御する温度制

御装置を作製した。温度制御装置には透明で膨張率の低い酸化インジウムスズ(ITO)を

素材として組み込んだ。電圧をかけることでステージ上の温度を上昇させ、冷却水を流

し、ステージ上の温度を低下させることで温度を制御した。この温度制御ステージ上に

ガラスチャンバーを取り付け、酸素制御装置と繋いだ。窒素ガスを流入させることで、

目的の酸素濃度に制御した混合ガスをガラスチャンバー内に送り、酸素濃度を制御した

(図3)。この顕微鏡システムを用いて実際に線虫をステージ上に乗せ、酸素濃度依存的

な温度受容ニューロンのカルシウムイメージングを行った。

超高速型の追尾システムと 3D 多波長イメージング装置の融合開発

立体的な高速撮影機構の実現のため、既製品である横河電機社の共焦点スキャナユニット CSU-W1 と高速 Z 軸スキャンを可能にするピーアイ社の対物レンズ用ピエゾステージを用いた。共焦点スキャナユニット CSU-W1 を用いることでフォーカスの合った部分だけを撮影できる。さらに、CSU-W1 は、マイクロレンズ付ニポウディスク方式を採用しており、広視野、高速撮影、低退色性を兼ね備えている。そのため、オートトラッキングによる線虫自由行動下の撮影で線虫が動き回った際にも視野から外れにくくなる。さらに、高速撮影が可能のため、短時間で複数フォーカス位置の撮影を行うことができ、低退色性により長時間の露光による影響を減らすこともできる。対物レンズピエゾステージは、圧電体に加えられた電圧を力に変換する圧電素子（ピエゾ素子）を用いた高速駆動かつサブナノメートルの分解能で位置決めが可能な対物レンズステージである。

この共焦点スキャナユニットと対物レンズピエゾステージをイメージングソフトウェア MetaMorph を用いて制御することで、高速かつ高精度で複数フォーカス位置の撮影が可能となる。また、多波長イメージングをおこなうための励起光源として、7 波長対応レーザー光源 LDI-7 を取り付けた。LDI-7 はカルシウムインディケータ yellow cameleon 3.60 の励起光、カルシウムインディケータ GCaMP を観察するための励起光、温度インディケータ tsGFP などを観察するための励起光を出すことができる。こ

これらの各波長のレーザーと蛍光タンパク質の蛍光波長に対応したフィルター、ミラーを導入した。この顕微鏡装置を用いて、まずは、遺伝子によってコードされる最新の温度インディケーターtsGFP (Kiyonaka, S., et al., *Nature commun.*, 2013)の観察をおこなった。

4. 研究成果

酸素濃度と温度を制御する顕微鏡システムの構築

IX81 倒立顕微鏡に東海ヒット社の酸素制御装置と温度制御装置を取り付け、酸素濃度と温度変化を同時に

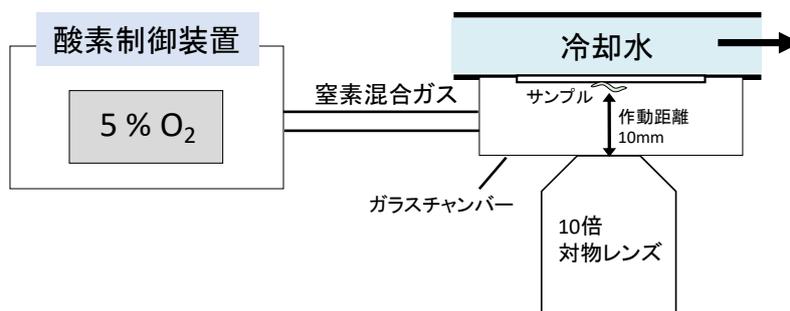


図4. 酸素濃度を制御しながら観察するシステム
制御しながら細胞の撮影をお

こなった。ワーキングディスタンスが10mmの10倍対物レンズで観察するために、ガラスチャンバーの高さを10mm以下で作製し、かつ酸素濃度が一定に保つために十分な容積を確保できるよう、縦横の長さをできる限り大きくし、ガラスを薄くするなどの工夫をした(図4)。酸素濃度制御装置に窒素ガスを流入させ、目的の酸素濃度に制御した混合ガスをガラスチャンバー内に送った。目的の酸素濃度に制御できているかを確認

するために酸素濃度計でガラスチャンバーに入った気体の酸素濃度を測定した。ガラスチャンバーに入った気体の酸素濃度を測定すると、目的の酸素濃度よりも 0.5~1%程度高くなったが、酸素制御装置の酸素濃度を低く設定することで、ガラスチャンバー内の酸素濃度を目的の酸素濃度にすることができた。さらに、この酸素濃度制御下でステージの温度を変化させたところ、温度プログラム通りにステージの温度が変化していた。この顕微鏡システムを用いて、線虫の温度受容ニューロンのカルシウムイメージングをおこなうことにより、実際に酸素濃度依存的な温度応答性を測定することができた。

超高速型の追尾システムと 3D 多波長イメージング装置の融合開発

細胞集団を超高速で自動追尾するために、IX83 倒立顕微鏡に共焦点スキャナユニット CSU-W1、対物レンズ用ピエゾステージ、オートトラッキング用精密自動ステージ装置を取り付けた。さらに、多波長イメージングを可能にするため、7 波長対応レーザー光源 LDI-7 を用いた。この顕微鏡を

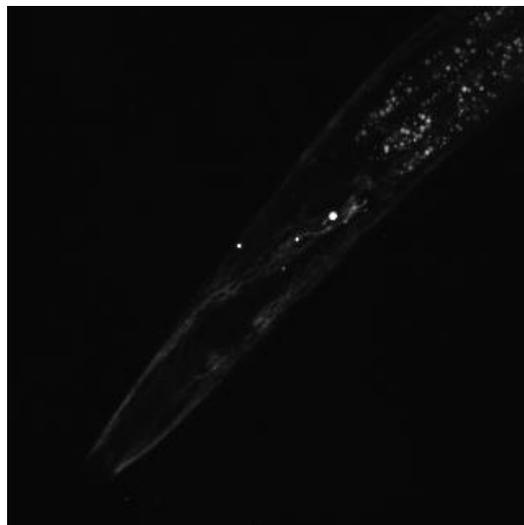


図 5. 400nm により励起された tsGFP

を用いて、実際に温度インディケーター-tsGFP を発現させた線虫の観察をおこなった。まずは、CSU-W1 の共焦点機能と対物レンズ用ピエゾステージを用いて高速で Z 軸画像

を取得するための実験系の確立をおこなった。tsGFP の励起光 405nm を当てた際の GFP 蛍光 510nm を浜松ホトニクス製の ORCA-Fusion BT デジタル CMOS カメラにより撮影した。その結果、tsGFP を発現させたミトコンドリアの網目構造を撮影することができた (図 5)。

5. 今後の展望

本研究では、酸素と温度を同時に制御しながら観察をおこなうための顕微鏡システムを立ち上げ、実際にカルシウムイメージングをおこなうことができた。さらに、超高速型自動追尾システムの確立をおこない、CSU-W1 の共焦点機能と対物レンズ用ピエゾステージにより、高速で Z 軸画像を取得することができた。今後、Z 軸に加え、XY 軸の自動追尾をおこなうことで超高速型自動追尾システムの確立を目指す。これらの実験系を確立することにより、将来的には生物学・医学の研究に貢献したいと考えている。具体的には、温度は精子の受精率に大きな影響を与えること、酸素濃度は精子形成の維持に重要な環境情報であることが報告されていることから (Morimoto et al., *Genes and Development*, 2021)、この顕微鏡システムを確立させることによって人工授精における活発な精子の絞り込みに役立つと考えられる。基礎生物学分野においても、運動中の神経細胞を多波長でイメージングできることから、従来の固定された単細胞イメージングに比べ、より複雑な神経回路の解析が可能となることが期待される。このように、本研

究は微細な多数の動的細胞を扱う生物学・医学分野の発展に寄与できると考えられる。

謝辞

本研究をおこなうにあたり、研究助成していただきました公益財団法人川西記念新明和教育財団の皆様に深く感謝申し上げます。

参考文献

Hiroko Morimoto et al., An interplay of NOX1-derived ROS and oxygen determines the spermatogonial stem cell self-renewal efficiency under hypoxia, *Genes & Development*, 35:250–260 (2021)

Okahata et al., Cold acclimation via the KQT-2 potassium channel is modulated by oxygen in *Caenorhabditis elegans*, *Science Advances*, 5 : eaav3631 (2019)