

「新たな光機能や光物性の発現・利活用を基軸とする次世代フォトニクスの
基盤技術」

H27 年度
実績報告書

平成27年度採択研究代表者

永井健治

大阪大学産業科学研究所
教授

超解像「生理機能」イメージング法の開発と細胞状態解析への応用

§ 1. 研究実施体制

(1) 永井グループ

- ① 研究代表者: 永井 健治 (国立大学法人大阪大学産業科学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・多元的超解像観察のための光スイッチング蛍光タンパク質波長変異体の開発
 - ・光スイッチング生理機能プローブの開発
 - ・細胞内熱産生におけるジュール熱仮説の検証

(2) 藤田グループ

- ① 主たる共同研究者: 藤田 克昌 (国立大学法人大阪大学大学院工学研究科、准教授)
- ② 研究項目
 - ・高次非線形光学効果を利用した超解像結像理論の構築
 - ・高次非線形蛍光応答の測定用装置の設計

(2) 鷲尾グループ

- ① 主たる共同研究者: 鷲尾 隆 (国立大学法人大阪大学産業科学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・超解像時系列画像データからの超解像細胞時間発展情報抽出手法の開発

§ 2. 研究実施の概要

我々は、従来の超解像顕微鏡では可視化できない細胞生理機能と密接に関係した過程を高い時空間分解能で可視化する超解像イメージング技術の開発を目指している(右図)。このために、生理機能超解像イメージングのためのプローブ開発、リアルタイム3次元超解像顕微鏡の開発、そして超解像時系列画像データからの細胞生理機能の特徴づける情報抽出手法の開発を目標として研究を開始した。今年度は、以下のような研究成果が得られた。



図. 研究概要の模式図。

(1) 生理機能超解像イメージングのためのプローブ開発と、細胞内熱産生におけるジュール熱計測系の確立

細胞内の多種類のタンパク質の超解像イメージングを実現するために、既に開発済みの光スイッチング緑色蛍光タンパク質と併用可能な 600 nm 以上の蛍光波長を有する光スイッチング赤色蛍光タンパク質の開発に取り組み、既存の赤色蛍光タンパク質よりも明るい蛍光と速い光スイッチング能を有する蛍光タンパク質を作成した。

細胞内生理機能を計測する超解像イメージング用プローブとして、 Ca^{2+} プローブと温度プローブの開発を行った。 Ca^{2+} プローブについては、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)型のプローブをデザインし、光スイッチング能と Ca^{2+} センシング能を備えたプローブの作成に成功した。また、超解像温度プローブについては、様々な光スイッチング蛍光タンパク質について蛍光の温度感受性を実験的に検討した。その結果選定した蛍光タンパク質をテンプレートとして温度プローブを作製し、その蛍光特性と温度特性の改良を進めた。

(2) 高次非線形光学効果を利用した超解像結像理論の構築と光学効果測定用装置の設計

細胞内機能の観察のための高い空間分解能かつ時間分解能を有する超解像顕微鏡の実現に向け、高次非線形光学効果を利用した結像理論の構築を行った。結像方式として、レーザー走査型、広視野型の2つについて、高次非線形光学効果の誘起方法、および空間分解能の見積もりを行った。

レーザー走査型の結像においては、スイッチング蛍光タンパク質を想定し、励起光強度に対する蛍光強度の2次以上の非線形な応答を利用して、蛍光発光を微小な領域に局在化する手法を検討した。さらに、新規蛍光タンパク質のスクリーニングのためにスイッチング特性を計測可能な分光光学系の設計を行った。広視野型の結像においては、高次の非線形効果に伴う発光分布を見積もり、この発光分布の制御によって超解像観察が可能であることを理論的に導出した。また、非

線形効果により誘起された蛍光発光の分布を正確に捉えることを可能とする顕微光学系を検討した。

(3) 超解像時系列画像データからの超解像細胞時間発展情報の高精度抽出手法の検討と高次非線形光学効果を利用した超解像結像原理の拡張検討

今年度は、細胞内の測定対象タンパク質分子の分布に関する一般的モデルを画像認識処理に導入することで、超解像細胞状態時間発展に関する情報を高精度に抽出する手法の検討を開始した。細胞内のタンパク質分子は、時空間的に連続に分布したり、フィラメント状に分布したりすることが予め知られていることが多い。このような定性的構造傾向を制約として構造正則化原理に適用することで、タンパク質分子の具体的な分布パターンを初期値として与えることなく超解像細胞時間発展情報の高精度抽出を行えると期待した。永井グループから提供された細胞内のタンパク質の分布画像データを用いて、構造正則化原理に基づく高精度抽出手法の検討を実施した。また、藤田グループの課題である非線形光学効果を利用した超解像結像原理についても、情報学的立場から現在の超解像レベルを超える結像を得る理論の検討を開始した。