

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
平成 27 年度採択研究代表者

H28 年度 実績報告書

永井 健治

国立大学法人大阪大学 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
 - ・高次非線形蛍光応答の測定用装置の開発
 - ・多点走査型超解像顕微鏡の開発

(3)「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

本研究課題では、従来の超解像顕微鏡では可視化できていない細胞生理機能を、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行っている。今年度は、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を特徴づける情報抽出手法の開発を行い、以下の研究成果を得た。

1. 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と機能超解像観察のための蛍光プローブ開発(永井グループ)

複数の細胞生理機能を同時に超解像観察するためプローブの開発を行った。超解像観察には、光の照射で蛍光を発生する状態としない状態を切替え可能な光スイッチング蛍光タンパク質をビルディングブロックとして使う必要がある。さらに、複数の細胞生理機能を同時に観察するためには、従来からある光スイッチング緑色蛍光タンパク質だけでなく、別の色の蛍光を発生する光スイッチング蛍光タンパク質が必要である。そこで、これまでに開発例がほとんどなく、超解像観察に必要な ON/OFF コントラストとスイッチング速度を有する光スイッチング赤色蛍光タンパク質(蛍光波長 600 nm 以上)の開発を行った。

また、特に重要な生理機能を高解像度で可視化する蛍光プローブとして、細胞内の 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、光スイッチング蛍光タンパク質 rsEGFP をベースにして開発した Ca^{2+} プローブ rPS-Twitch3、および Dreiklang-SSS をベースにして開発した Ca^{2+} プローブを試作し、機能評価を行った。温度プローブについては、リアルタイムで細胞内の温度の絶対値測定が可能なレシオメトリック型プローブである gTEMP を開発した¹⁾。

2. 高次非線形蛍光応答の測定用装置の開発、および多点走査型超解像顕微鏡の開発(藤田グループ)

光スイッチング蛍光タンパク質の光学応答特性を評価するための、顕微分光装置の設計・構築を行った。超解像生理機能イメージングを達成するためには、生体試料の超解像観察に適したプローブを探索して、試料の観察条件を最適化することが重要なため、顕微鏡下で複数の励起波長で試料を照明しプローブの分光特性・時間応答を評価する装置が必要である。既存の光スイッチング蛍光タンパク質を、今回設計した装置で測定し、非線形光学特性を示す結果を得た。また、高次非線形光学応答を利用した超解像観察のための、広視野型およびレーザー走査型の超解像顕微鏡システムの検討を行った。広視野型の超解像顕微鏡は光学装置の設計・試作を行い、光スイッチング蛍光タンパク質を用いた超解像観察への応用に向けた観察を開始した。レーザー走査型の超解像顕微鏡の結像特性を理論的、実験的に見積もり、空間分解能の向上を明らかにした²⁾。多点走査型の超解像顕微鏡システムにおいても装置の設計・試作を行った。

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(鷺尾グループ)

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及び開発、性能検証を実施した。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ことを確認した。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及び開発、性能検証を実施した。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構成画像のノイズを低減する手法の理論的可能性について検討を行った。

主要論文

- [1] Nakano, M., Arai, Y., Kotera, I., Okabe, K., Kamei, Y., Nagai, T. (2017) Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response. PLoS ONE 12: e0172344.
- [2] Oketani, R., Doi, A., Smith, N. I., Nawa, Y., Kawata S., Fujita K. (2017) Saturated two-photon excitation fluorescence microscopy with core-ring illumination. Opt. Lett. 42: 571-574.