

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中盤技術  
平成 27 年度採択研究代表者

H29 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 (大阪大学産業科学研究所、教授)
- ② 研究項目
  - ・機能超解像プローブの開発
  - ・超解像細胞生理機能イメージングによる細胞情報熱化学研究および細胞状態診断法開発

### (2) 藤田グループ

- ① 主たる共同研究者: 藤田 克昌 (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、および蛍光応答測定装置の開発
  - ・多点走査型超解像顕微鏡の開発
  - ・構造化シート照明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 (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
  - ・超解像細胞時間発展情報からの生理機能情報抽出手法の開発

## § 2. 研究実施の概要

本研究課題の目的は、細胞の生理機能を高い時空間分解能で観察するための超解像生理機能イメージング技術の開発とその細胞熱化学研究への応用である。これを実現するために、高性能な光スイッチング蛍光タンパク質の開発、それらを用いた光スイッチング生理機能計測用プローブの開発、光スイッチング生理機能計測用プローブを高解像度で観察するための超解像顕微鏡の開発、そして超解像顕微鏡の出力データより細胞生理機能の高解像度・高時間分解能の時空間発展情報を抽出する手法の開発を、これまでに進めている。

今年度に永井グループで開発した主な蛍光タンパク質は、Gamillus、rsCherryRev2.0 そして SPOON である。Gamillus は、酸性環境下でも安定した蛍光発光をする蛍光タンパク質であり、従来の蛍光タンパク質では可視化できなかった酸性の細胞内小器官のイメージングを可能にした [1]。rsCherryRev2.0 は、光スイッチング赤色蛍光タンパク質であり、従来よりも高い ON/OFF コントラストを達成した。これにより、1分子局在顕微鏡法超解像イメージングの高分解能化が可能になった。SPOONは、ONスイッチング・OFFスイッチング・蛍光励起を3つの別々の波長の光で行うものであり、さらにオフ状態からオン状態へ自発的に速く遷移する。SPOON は、1分子局在顕微鏡法、SPoD-ExPAN、非線形 SIM への応用が期待される。

生理機能計測用のプローブとしては、永井グループで  $\text{Ca}^{2+}$ プローブおよび温度プローブの開発を進めてきた。 $\text{Ca}^{2+}$ プローブとしては、FRET ベースの光スイッチングプローブの開発を行い、ドナーを SPOON、 $\text{Ca}^{2+}$ センシングドメインを rPS-Twitch3、そして様々な蛍光タンパク質をアクセプターとするものを作成し、機能評価を行った。また、温度プローブについては、昨年度開発した温度プローブ gTEMP の励起波長が紫外域であり応用範囲が限定的であったため、可視光域の励起波長を持つものの開発を行った。

永井グループで開発した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に、藤田グループにおいて、顕微分光装置の構築を行った。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であり、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。構築した装置を用いて光スイッチング蛍光タンパク質の測定を行い、非線形な光スイッチング特性が得られることを確認した。

高次非線形光学応答を利用した超解像観察を行うため、藤田グループではレーザー走査型および広視野型の超解像顕微鏡装置の構築を行った。レーザー走査型の超解像顕微鏡の開発において、多点走査型の可視二光子励起顕微鏡の開発を行い、試料を3次元超解像かつ高速で観察が可能な装置を構築した。この装置の3次元空間分解能の評価を行い、生細胞を超解像で動画観察することに成功した。また、二光子顕微鏡において、試料内部での点像分布関数を光学的に計測することにより高い空間分解能を得る手法を開発し、理論的・実験的に空間分解能の向上を明らかにした [2]。広視野型の超解像顕微鏡については、非線形構造化照明顕微鏡の構築を行った。この顕微鏡で取得する画像データから超解像構築するプログラムの開発をドイツの研究グループと共同で行い、光スイッチング蛍光タンパク質を用いた超解像観察に応用した。さらに、鷲尾グループは、藤田グループからサンプルデータの提供を受けて、非線形構造化照明顕微鏡のた

めの正確な超解像画像を再構成するための計算手法の開発を最新の情報理論に基づいて進めている。これにより、光毒性の少ない非線形構造化照明顕微鏡観察法を確立できるものと期待される。

永井グループと鷺尾グループでは、蛍光偏光の利用によって発生させる蛍光変調、高速光スイッチング蛍光タンパク質 Kohinoor、そして正則化最尤法に基づく超解像画像再構成計算を用いることにより、高生体適合性の SPoD-ExPAN 超解像イメージング技術の開発を行った。これにより、従来の多くの超解像イメージングで用いる照明強度に対して  $1/10^2 \sim 1/10^6$  程度の極めて弱い照明光で高解像度化を実現するとともに、従来型 SPoD-ExPAN 超解像イメージングで問題となっていた画像再構成計算におけるアーティファクトの問題を解決した。

代表的な原著論文

- (1) Hajime Shinoda, Yuanqing Ma, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Tomoki Matsuda and Takeharu Nagai, "Acid-Tolerant Monomeric GFP from *Olindias formosa*", *Cell Chemical Biology*, vol. 25, No.3, pp.330-338, 2018
- (2) Atsushi Doi, Ryosuke Oketani, Yasunori Nawa, and Katsumasa Fujita, "High-resolution imaging in two-photon excitation microscopy using in situ estimations of the point spread function", *Biomed. Opt. Express*, vol. 9, No. 1, pp. 202-213, 2018