

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

2018 年度 実績報告書

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. 研究成果の概要

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情報熱化学研究への応用である。これを実現するために、超解像イメージング用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進めている。

永井グループでは、新規蛍光タンパク質として rsGamillus および Kohinoor 2.0 を開発した。rsGamillus は、酸性環境中でも安定に光スイッチングを行うとともに明るい蛍光を発する蛍光タンパク質であり、従来困難であった酸性の細胞内小器官における超解像イメージングを可能にした。Kohinoor2.0 は、永井グループが以前開発した光スイッチング蛍光タンパク質 Kohinoor の蛍光強度を増強した改良型である。また、生理機能計測用のプローブについては、Ca²⁺プローブおよび温度プローブを開発した。Ca²⁺プローブとしては、Ca²⁺センシングドメイン(Twitch 由来 Ca²⁺結合タンパク質)と2つの蛍光タンパク質(光スイッチング蛍光タンパク質と赤色蛍光タンパク質)を組み合わせた FRET 型プローブを開発した。温度プローブとしては、2つの吸収帯を有する赤色蛍光タンパク質温度プローブおよび温度感受性ドメインを有する FRET 型温度プローブを開発した。さらに、これらを用いた細胞内の温度分布観察に着手した。

藤田グループでは、高次非線形蛍光応答を測定する装置、および、それを利用した超解像観察を行うための装置を構築・改良した。高次非線形蛍光応答を測定する装置では、使用可能な励起波長の追加、イメージングスピードの向上といった改良を行った。永井グループで開発された光スイッチング蛍光タンパク質の測定を行い、パルスレーザーを用いたアクティベーションによるスイッチング効率の非線形応答および飽和応答を有するタンパク質を確認した。また、飽和応答による非線形信号を、励起強度を変えながら取得した画像の差分により抜き出す手法を開発し、共焦点顕微鏡での空間分解能の向上を確認した。レーザー走査型の超解像顕微鏡装置では、昨年度までに構築・改良した多点走査型の可視二光子励起顕微鏡を用いて、カルシウムイオンセンサーによる超解像イメージングを行なった。また、多点走査型光学系の結像特性を詳細に理解するため、実際に使用した検出系を模した数値計算を行い、奥行き分解能の向上を確認した。広視野型の顕微鏡では、非線形構造化照明顕微鏡について光学系の改良を行い、縞照明パターンのビジビリティを向上することで取得イメージの高コントラスト化を実現した。さらに、構造化照明顕微鏡の開発で得られた知見を基にし、光スイッチング蛍光タンパク質を用いたライトシート型超解像顕微鏡を構築中である。

鷲尾グループでは、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において、標準的には9回のレーザー光照射でSIM超解像イメージングを行うところを、スパース学習原理の導入によって、1回のレーザー光照射でSIM超解像イメージングを行う手法の研究開発に取り組んだ。これにより、9分の1の低光照射量でかつ9倍高速に、対象細胞の色素光退色やダメージを抑えつつ状態の時間発展情報を高時間分解能でイメージングできる見通しを得た。また、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においては、深層学習を用

いた加速計算により SPoD-OnSPAN 超解像イメージングの計算処理を飛躍的に高速化する手法の研究開発に取り組んだ。本技術によって従来の計算量の壁を打ち破り、対象細胞の時間発展情報から生理機能情報を抽出するために必要な SPoD-OnSPAN 超解像動画像のリアルタイム計算を実現し得る可能性を明らかにした。

【代表的な原著論文】

1. Tetsuichi Wazawa, Yoshiyuki Arai, Yoshinobu Kawahara, Hiroki Takauchi, Takashi Washio, Takeharu Nagai, “Highly biocompatible super-resolution fluorescence imaging using the fast photoswitching fluorescent protein Kohinoor and SPoD-ExPAN with Lp-regularized image reconstruction”, *Microscopy*, vol. 67, No. 2., pp. 89–98, 2018
2. Yoshiyuki Arai, Hiroki Takauchi, Yuhei Ogami, Satsuki Fujiwara, Masahiro Nakan, Tomoki Matsud, Takeharu Nagai, “Spontaneously blinking fluorescent protein for simple single laser super-resolution live cell imaging”, *ACS Chemical Biology*, vol. 13, No. 8, pp. 1938-1943, 2018
3. Yasunori Nawa, Yasuo Yonemaru, Atsushi Kasai, Ryosuke Oketani, Hitoshi Hashimoto, Nicholas I. Smith, and Katsumasa Fujita, “Saturated excitation microscopy using differential excitation for efficient detection of nonlinear fluorescence signals”, *APL Photonics*, Vol. 3, pp.080805, 2018

§ 2. 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
 - ・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の開発
 - ・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 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