

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  
2015年度採択研究代表者

2019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・高時空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、多元的生理機能超解像プローブの開発、生理機能超解像イメージングそして細胞情報熱化学のイメージング実験系の構築を行った。多元的超解像プローブ開発では、超解像観察可能な蛍光波長帯の広域化を狙い、緑色蛍光タンパク質(GFP)類似蛍光タンパク質としては世界に先駆けて 410 nm 台の最短波長の蛍光帯を有する紫色蛍光タンパク質の開発と、赤色・近赤外蛍光を有する  $\text{Ca}^{2+}$ 超解像プローブの開発を行った。生理機能超解像イメージングでは、今年度開発した赤色・近赤外蛍光超解像  $\text{Ca}^{2+}$ プローブを超解像イメージング手法の一つである SRRF で観察することで、高空間分解能で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 分布を測定する手法の開発に着手し、進めているところである。また、多元的生理機能超解像イメージングに向けた準備として、本研究課題で開発した高生体適合性 SPoD-OnSPAN 超解像イメージングと、明るい蛍光・速い光スイッチング速度を有する緑色蛍光タンパク質を用いて、哺乳類細胞中の細胞骨格ダイナミクスを 4 時間以上に渡って超解像観察可能であることを確認した。さらに、細胞情報熱化学実験として、光刺激でイオンを透過するチャネルロドプシンを発現させたヒト由来細胞における光刺激によるイオン透過を制御する実験系の確立を行うことで、我々が提唱するジュール熱仮説検証へ向けた研究を進めた。

藤田グループでは、高次非線形蛍光応答の測定装置およびそれを利用した超解像観察を行う装置を構築・改良した。高次非線形蛍光応答の測定では、開発した蛍光プローブのスクリーニングシステムを自動化し、一度に多種の蛍光タンパク質の蛍光応答を測定可能にした。永井グループから提供されたスイッチング蛍光タンパク質において、多光子励起を利用することで2次から4次の高次非線形応答を確認した。これをレーザー走査型共焦点顕微鏡に応用し、3次元に高解像な撮像に成功した。また、蛍光タンパク質の蛍光の高次非線形応答を高効率に抽出する手法を開発し、従来に比べて 2.3 倍効率よく抽出できることを理論的に確認した。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、縞照明パターンのビジビリティ向上を進め、永井グループが開発したスイッチング蛍光プローブを用いて、HeLa 細胞の超解像イメージングを達成した。また、本手法をライトシート照明と組み合わせた手法を開発し、厚みのあるサンプルにおいて背景光が減少することを結像特性の理論計算によって確認した。さらに、この理論を実装した装置を構築し、蛍光ビーズ、及び HeLa 細胞の観察において空間分解能の向上を確認した。さらに、オックスフォード大学との共同研究により、補償光学導入のための基礎原理の確認実験を行い、シート照明型構造化照明顕微鏡へ実装するための光学設計を行った。

鷲尾グループでは、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、深層学習を用いた加速計算により SPoD-ExPAN 超解像イメージングの超解像画像再構成計算処理を飛躍的に高速化する手法の研究開発とその性能検証に取り組んだ。本技術によって従来の

計算量の壁を打ち破り、数百倍から 1000 倍高速に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-ExPAN 超解像動画像のリアルタイム計算を実現した。さらに、SPoD-ExPAN 超解像顕微鏡画像の空間適応型超解像イメージング手法の開発にも取り組んだ。従来手法では、超解像顕微鏡のボケ特性を決める点像分布関数のパラメータが画像視野内の空間位置に依存して変動してしまう場合があった。これによって視野内の位置によって得られる超解像画像の解像度や品質にムラが生じてしまっていた。この問題に対し、撮影画像から視野内の各位置のパラメータを推定し、自動的に画像補正を行う原理を開発した。この結果、解像度と品質により優れた超解像画像を得る見通しを得た。

#### 【代表的な原著論文】

1. Satoshi Hara, Weichih Chen, Takashi Washio, Tetsuichi Wazawa, Takeharu Nagai, SPoD-Net: Fast Recovery of Microscopic Images Using Learned ISTA, Proc. The Eleventh Asian Conference on Machine Learning, Proceedings of Machine Learning Research (PMLR) Vol.101, pp.694-709, 2019
2. Hajime Shinoda, Kai Lu, Ryosuke Nakashima, Tetsuichi Wazawa, Kosuke Noguchi, Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai. "Acid-Tolerant Reversibly Switchable Green Fluorescent Protein for Super-resolution Imaging under Acidic Conditions", Cell Chemical Biology, vol. 26, No. 10, pp.1469-1479, 2019
3. Ryosuke Oketani, Haruka Suda, Kumiko Uegaki, Toshiki Kubo, Tomoki Matsuda, Masahito Yamanaka, Yoshiyuki Arai, Nicholas I. Smith, Takeharu Nagai, Katsumasa Fujita, "Visible-wavelength two-photon excitation microscopy with multifocus scanning for volumetric live-cell imaging," J. Biomed. Opt. Vol. 25, No. 1, pp. 014502, 2020

## § 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
  - ・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