

分野：工学系

キーワード：バイオイメージング、光学顕微法、蛍光、超解像、SDGs

## 生体内部が見える超解像顕微法を開発 — 3D多細胞組織内部を高解像で観察可能に —

### 【研究成果のポイント】

- ◆ 厚みのある細胞や 3D 多細胞組織の内部を観察可能な超解像蛍光顕微法<sup>※1・2</sup>を開発。
- ◆ これまでの超解像顕微法は、焦点外からの背景光<sup>※3</sup>を多く生じる生体内部の観察には向かず、主に試料表面や薄い生体試料の観察で利用されていた。
- ◆ 生体により近い性質をもつ 3D 多細胞組織<sup>※4</sup>を利用する生物、医、薬学の幅広い研究に役立ち、顕微観察技術の進展にも貢献する成果。

### ❖ 概要

大阪大学大学院工学研究科の天満健太 助教、桶谷亮介 特任研究員(常勤)(研究当時/現:九州大学理学研究院助教)、藤田克昌 教授らの研究グループは、同大学産業科学研究所の永井健治 教授、大学院医学系研究科の上西達也 助教、大学院生命機能研究科 濱崎万穂 准教授、ドイツ・イェナ大学の Rainer Heintzmann 教授らと共に、生体内部を観察できる新たな超解像顕微法を開発することに成功しました。従来の超解像顕微法の多くは、焦点外からの背景光が多く発生する生体内部の観察への利用は難しく、主に試料の表層付近や薄い生体試料の観察に用途を制限されてきました。

今回、本研究グループは、薄いシート状の照明と、光スイッチング蛍光タンパク質<sup>※5</sup>を用いて選択的に発光領域を限定するシートアクティベーション型構造化照明顕微法(Selective-plane-activation structured illumination microscopy, SPA-SIM)を開発しました。この顕微法は、試料の発光を観察対象面に限定することで背景光の発生を抑制し、そこに縞状の光を照明することで生体内部の超解像観察を可能とします。

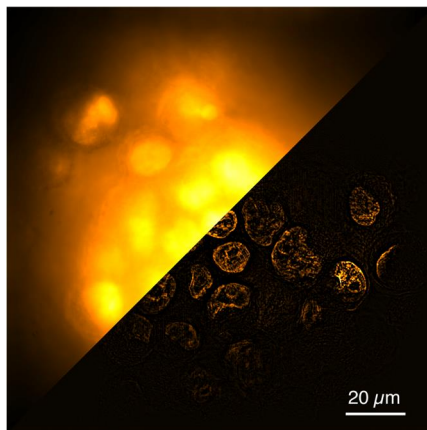


図1 細胞スフェロイド(直径 100 $\mu\text{m}$ 、深さ 43 $\mu\text{m}$ での観察)の蛍光像。  
従来の光学顕微法(左上)と開発法 SPA-SIM(右下)

## Press Release

本研究では、開発した技術を用いて、従来手法では観察の難しい立体的な形状の細胞スフェロイド<sup>※6</sup>の内部構造を超解像観察することに成功しました(図1)。本技術は単一細胞内部の詳細な観察が可能であるのみでなく、近年関心を集めている 3D 多細胞組織(スフェロイド、オルガノイド)の観察に利用可能です。これらの試料を用いた、生物、医、薬学研究への幅広い貢献が期待されます。

本研究成果は、英国科学誌「Nature Methods」に、4月5日(金)(日本時間)に公開されます

### ❖ 研究の背景

超解像顕微法は高い解像度で生体を観察するのに有効な技術です。中でも縞状の光を照明して空間分解能を向上させる構造化照明顕微鏡(SIM)<sup>※7</sup>は、比較的弱い光強度で低侵襲に高速な観察を行うことができるため、生体の構造や動態を観察するのに広く用いられています。しかし、生体内部では観察用対物レンズの焦点外から発生する背景光が観察の妨げとなるため、観察対象は試料の表層付近に限られていました。

### ❖ 研究の内容

本研究グループでは、観察用対物レンズの焦点よりも薄いシート状の照明と、発光状態の on/off を切り替え可能な光スイッチング蛍光タンパク質を用いて、選択的に発光する領域を限定することで生体内部における背景光の発生を抑制することに成功しました。さらに、限定した発光領域に縞状の光を照明し蛍光を検出することで生体内部を超解像観察可能なシートアクティベーション型構造化照明顕微法(SPA-SIM)を開発しました(図2)。実験では、開発した顕微法を用いて生きた細胞の 3D 観察を行い、従来法では背景光が重なり見えない構造が明瞭に観察できるようになったことを確認しました(図3)。さらに従来法では観察が難しかった細胞スフェロイドの内部構造を超解像観察することに成功しました(図4)。また、開発した顕微法は観察面内方向に 140nm、奥行き方向に 300nm という三次元的に高い空間分解能を有することを理論、実験的に確認しています。

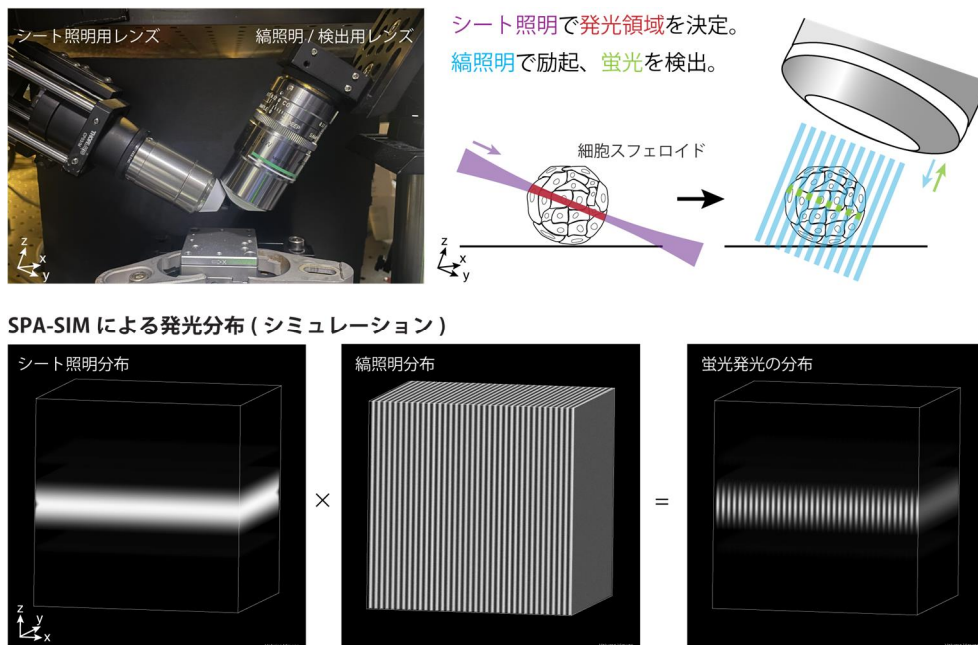


図2 SPA-SIMの対物レンズ配置(左上)。蛍光イメージングの過程(右上)。シート照明により発光領域を決定し、そこに縞状の光を照明する。シートで照明した領域からのみ蛍光が発生する。(下図)蛍光発光分布のシミュレーション結果。観察方向(z)の発光領域が限定される。

## Press Release

### ❖ 本研究成果が社会に与える影響(本研究成果の意義)

本研究成果により、従来の超解像顕微鏡の利用が及ばなかった生体内部の観察が可能となりました。これは顕微鏡技術の進展において重要なマイルストーンとなります。また近年、細胞スフェロイドやオルガノイドといった 3D 多細胞組織が生体発生や、疾患の原因究明、また生体の薬剤応答の観察といった幅広い分野の研究において関心を集めていますが、詳細な空間分布を観察することは困難でした。本研究はこれらを高い空間分解能で生きたまま観察可能であり、これまで見ることができなかった現象を明らかにできる新たな技術となることが期待されます。

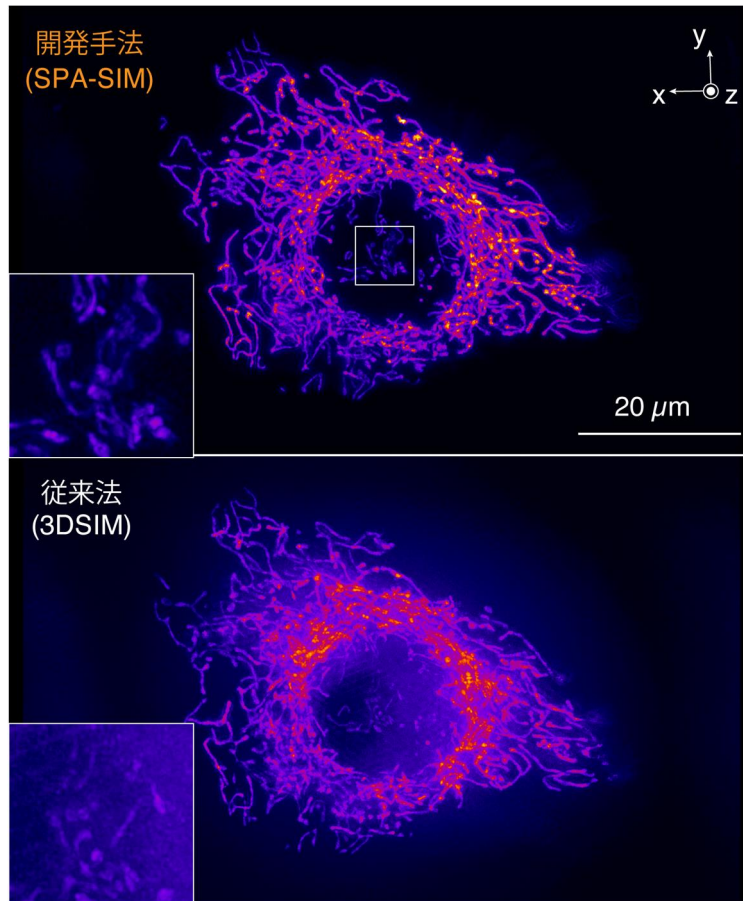


図 3 細胞の3D 蛍光像。開発した SPA-SIM(上)では従来の超解像顕微鏡(下)に比べ明瞭な観察が可能。

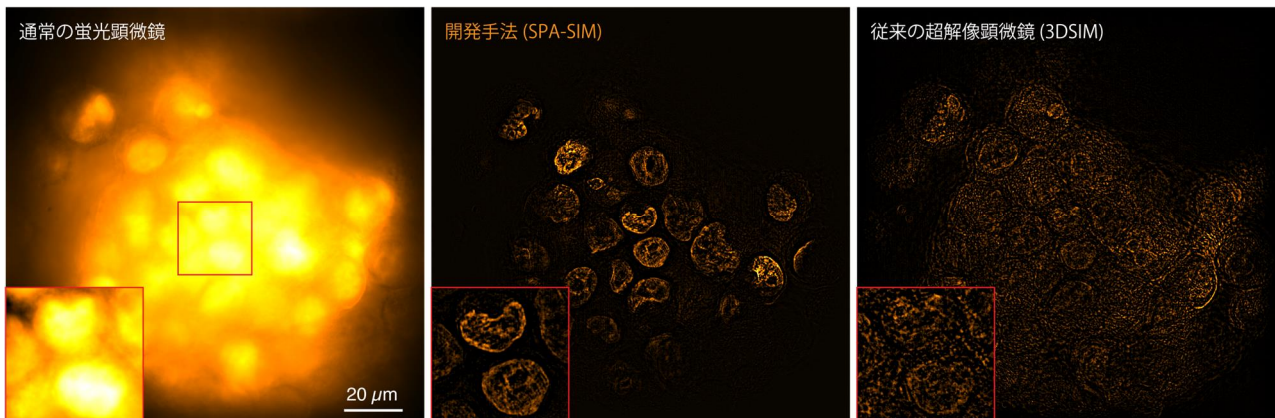


図 4 細胞スフェロイド(直径 100 $\mu$ m、深さ 43 $\mu$ m)での観察の蛍光像。通常の蛍光顕微鏡(左)では観察できない試料内部の構造を SPA-SIM(真ん中)では明瞭に観察可能。また従来の超解像顕微鏡(右)では観察は不可能。



❖ 特記事項

本研究成果は、2024年4月5日(金)(日本時間)に英国科学誌「Nature Methods」(オンライン)に掲載されます。

タイトル: “Selective-plane-activation structured illumination microscopy”

著者名: Kenta Temma<sup>†</sup>, Ryosuke Oketani<sup>†</sup>, Toshiki Kubo, Kazuki Bando, Shunsuke Maeda, Kazunori Sugiura, Tomoki Matsuda, Rainer Heintzmann, Tatsuya Kaminishi, Koki Fukuda, Maho Hamasaki, Takeharu Nagai and Katsumasa Fujita

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-024-02236-3>

本研究は、科学技術振興機構(JST) 戦略的研究推進事業 CREST(JPMJCR1925、JPMJCR15N3)、共創の場形成支援プログラム COI-NEXT(JPMJPF2009)、文部科学省科学研究費助成事業新学術領域研究(18H05410)、物質・デバイス領域共同研究拠点の支援を得て行われました。

❖ 用語説明

※1 超解像蛍光顕微鏡法

従来の光学顕微鏡の限界を超えた高い解像度で、試料を観察できる顕微鏡手法。本稿では蛍光を信号として用いるものを指す。超解像蛍光顕微鏡法の一つである STED、PALM といった手法は 2014 年のノーベル化学賞を受賞している。

※2 蛍光

物質が特定の波長域の光を吸収し、異なる波長の光を放出する現象。蛍光を発する物質で観察したい構造体を標識することで、その構造体の空間分布を観察することが可能(蛍光顕微鏡)。

※3 背景光

観察用対物レンズの焦点以外から発生し、検出される光。顕微観察では、焦点にある観察対象からの信号と重なって検出されるため、明瞭な観察を妨げる。

※4 3D 多細胞組織

複数の細胞から成る立体的な細胞組織(スフェロイドやオルガノイド)。2次元培養細胞よりも生理学的に個体に近いことから、近年、再生医療、がん生物学など幅広い分野で観察対象として関心を集めている。

※5 蛍光タンパク質

蛍光を発するタンパク質の総称。2008年のノーベル化学賞で知られる下村脩博士らが、1962年にオワンクラゲから初めて蛋白質を単離し、緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein, GFP)と命名した。中でも光スイッチング蛍光タンパク質は発光状態を光励起によって切り替え可能なものを指す。

※6 細胞スフェロイド

複数個の細胞が球状の塊となった細胞凝集塊。3次元培養により球形に組織化される。2次元培養細胞よりも個体に近い機能、形状を有する。

## Press Release

### ※7 構造化照明顕微鏡(SIM)

縞状の光を試料に照明することで空間分解能を向上させる超解像顕微法の一つ。試料の構造と縞照明の干渉によって生じるうなり現象(モアレ縞)を用いて従来の顕微鏡では検出できない微細な構造の情報を復元する。

### ❖ SDGs目標



#### 【天満助教のコメント】

私たちは、様々な光学現象を駆使して見えなかったものを見るようにする顕微技術を開発しています。今回の技術では光を時空間的に変調し、さらに光スイッチング蛍光タンパク質を用いることで、従来技術では難しかった生体内部の超解像観察を実現しました。これに留まらず、これからも人を驚かせられるような、そして誰かの役に立つような顕微法開発に取り組んでいきます。

### ❖ 参考 URL

大阪大学大学院工学研究科藤田研究室

URL: [https://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/home\\_j.html](https://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/home_j.html)

大阪大学産業科学研究所永井研究室

URL: <https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/bse/index.html>

大阪大学先導的学際研究機構

URL: <https://otri.osaka-u.ac.jp>

大阪大学大学院工学研究科附属フューチャーイノベーションセンター

URL: <https://www.cfi.eng.osaka-u.ac.jp/>

### ❖ 本件に関する問い合わせ先

<研究に関すること>

大阪大学 大学院工学研究科 助教 天満健太(てんまけんた)

E-mail: [temma\[at\]ap.eng.osaka-u.ac.jp](mailto:temma[at]ap.eng.osaka-u.ac.jp)

大阪大学 大学院工学研究科 教授 藤田克昌(ふじたかつまさ)

E-mail: [fujita\[at\]ap.eng.osaka-u.ac.jp](mailto:fujita[at]ap.eng.osaka-u.ac.jp)

<JST事業に関すること>>

科学技術振興機構 戦略研究推進部 ライフイノベーショングループ 保田睦子(やすだむつこ)

TEL: 03-3512-3524 FAX: 03-3222-2064

E-mail: [crest\[at\]jst.go.jp](mailto:crest[at]jst.go.jp)

<広報・報道に関すること>

大阪大学 工学研究科 総務課 評価・広報係

TEL: 06-6879-7231

E-mail: [kou-soumu-hyoukakouhou\[at\]office.osaka-u.ac.jp](mailto:kou-soumu-hyoukakouhou[at]office.osaka-u.ac.jp)



国立大学法人 大阪大学

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-1

TEL: 06-6877-5111 (代)

[www.osaka-u.ac.jp](http://www.osaka-u.ac.jp)

## Press Release

大阪大学 産業科学研究所 広報室

TEL: 06-6879-8524

E-mail: [kouhou-staff\[at\]sanken.osaka-u.ac.jp](mailto:kouhou-staff[at]sanken.osaka-u.ac.jp)

大阪大学 大学院医学系研究科 広報室

TEL: 06-6879-3387

E-mail: [medpr\[at\]office.med.osaka-u.ac.jp](mailto:medpr[at]office.med.osaka-u.ac.jp)

科学技術振興機構 広報課

TEL: 03-5214-8404 FAX: 03-5214-8432

E-mail: [jstkoho\[at\]jst.go.jp](mailto:jstkoho[at]jst.go.jp)