

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「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」  
研究課題「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」

## 研究終了報告書

研究期間 2015年 12月～2021年 3月

研究代表者： 永井健治  
(大阪大学産業科学研究所、教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

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を開発し、細胞内熱産生メカニズムとして我々が提唱している「ジュール熱仮説」を検証するとともに、細胞内生理機能の超解像時間発展データから細胞状態を診断する手法を開発することである。このために、細胞の生理機能に極力摂動を与えずに超解像イメージングを行うための超解像顕微鏡、生理機能を超解像イメージングするための蛍光プローブ、そして超解像画像データから生理機能の高解像度画像を再構成する手法の開発を行った。

細胞の生理機能に極力摂動を与えずに細胞の超解像画像の時間発展を取得するため、蛍光プローブの光スイッチングや非線形蛍光応答を利用した超解像イメージング技術を開発した。永井グループで新規開発した高輝度光スイッチング蛍光タンパク質と回転偏光照明光学系を有する蛍光顕微鏡、そして鷺尾グループが機械学習手法を用いて開発した低アーティファクトな画像再構成計算を組み合わせた、光毒性の極めて低い超解像観察手法 SPoD-OnSPAN を開発した。さらに、鷺尾グループは従来の超解像再構成計算の反復最適化計算過程を模擬する復元モデルを観測データから深層学習しておく計算手法を開発することで、膨大な計算時間が掛かっていた画像再構成計算を数百倍以上高速化することに成功した。

藤田グループでは、熱を始めとする生体内での反応を捉えるため、高時間分解能での超解像観察が可能な、高次非線形蛍光応答を利用した超解像観察手法開発を行った。可視光 2 光子励起による非線形応答と多点走査を組み合わせ高速観察が可能な多点走査型超解像顕微鏡を製作し、2 秒/体積のフレームレートで細胞内 3 次元動態の超解像観察に成功した。また、2 つの空間光位相変調器による励起光・スイッチング光同時照明が可能な非線形構造化照明超解像顕微鏡を製作し、永井グループが開発した光スイッチング蛍光タンパク質を用いた超解像タイムラプス観察に成功した。さらに、シート照明を組み込むことで焦点面近傍のみを励起できる構造化照明顕微鏡を開発し、生細胞の 3 次元超解像観察に成功した。

超解像生理機能イメージングのため、蛍光タンパク質と生理機能測定用蛍光タンパク質プローブを作製した。蛍光タンパク質としては、簡易な蛍光顕微鏡光学系で 1 分子局在超解像観察が可能な自発ブリンキング緑色蛍光タンパク質 SPOON、酸性細胞小器官中の観察も可能な耐酸性の緑色蛍光タンパク質 Gamillus とその光スイッチング変異体 rsGamillus、蛍光タンパク質では世界最短波長の紫蛍光を発する Sumire、そして高蛍光強度・高速光スイッチング蛍光タンパク質 Kohinoor2.0 を開発した。生理機能プローブとしては、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく光スイッチング型  $\text{Ca}^{2+}$  プローブ ps-cameleon と、同じく FRET に基づく自発ブリンキング型  $\text{Ca}^{2+}$  プローブ sb-cameleon、二つの蛍光タンパク質の蛍光強度温度依存性の差異を利用した紫外光励起型レシオメトリック温度プローブ gTEMP および青色光励起型レシオメトリック温度プローブ B-gTEMP、そして温度変化に応じて構造が大きく変化する ELP (Elastin-Like-Polypeptide) を利用した FRET 型温度センサー ELP-TEMP を開発した。さらに、蛍光タンパク質の ESPT (Excited State Proton Transfer) に変調を掛けることで様々な生理機能プローブ群 (EDITs) が作製可能な一般化手法を考案した。この手法で、酸化還元状態、ATP、NADPH の一連の生理機能プローブのプロトタイプを作製を行った。

細胞内熱産生メカニズム研究では、チャネルタンパク質のイオン電流に起因する熱産生の可能性 (『ジュール熱仮説』) を、理論的・実験的に検証している。超解像生理機能イメージングは  $\text{Ca}^{2+}$  を中心に進めており、 $\text{Ca}^{2+}$  超解像プローブである sb-cameleon を発現した哺乳類細胞の SPoD-OnSPAN による観察で、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  変化の超解像観察に成功した。また次世代フォトンクス領域の国際連携支援によって始まった University College London の Henrique 研との共同研究により、 $\text{Ca}^{2+}$  プローブ ps-cameleon と LiveSRRF によって  $\text{Ca}^{2+}$  超解像イメージングを行い、ヒスタミン刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  振動の検出に成功した。現在開発中の超解像生理機能プローブはプロトタイプができ次第、これまで開発した各超解像顕微鏡を用いて超解像生理機能イメージングを行う。また、光スイッチング能を持たない生理機能プローブについては、線形構造化照明顕

顕微鏡法や SRRF で超解像イメージングを行う。

ジュール熱仮説の検証では、光刺激でチャネル電流発生を制御可能なチャネルロドプシンと高感度な温度変化検出が可能な ELP-TEMP を用い、チャネル電流発生にともなう温度変化の検出を実施している。また、高速で温度変化測定が可能な温度プローブ B-gTEMP により、細胞内の過渡温度分布イメージングが可能なことを実証した。このように、チャネルタンパク質からの熱発生の検出や、細胞内温度分布の解析から細胞内熱伝導度や熱伝導抵抗についての情報が得られる段階までこぎつけた。さらに、これらのデータの理論的な検証を行っており、チャネルタンパク質の電場、イオンの拡散・ドリフト、そして熱伝導を考慮した理論考察を進めている。

細胞状態診断法は、がん細胞の酸化ストレス耐性の診断に問題設定して開発を行っている。通常の顕微鏡の 1000 倍にもおよぶ広視野をサブ細胞レベルの空間分解能でワンショット観察が可能なトランススケールスコープを用いて百万個以上の細胞の蛍光・透過像を取得し、ここで得られた個々の細胞の形状と細胞内温度や酸化還元状態分布等のビッグデータを機械学習により関連付けることで、透過像から細胞の酸化ストレス耐性を予測する。永井チームにおいて、細胞の温度イメージングに加えて、酸化ストレス耐性の細胞ごとのばらつきを、通常規模の蛍光顕微鏡を用いた観察で可視化することに成功している。今後、得られたデータを用いた機械学習による解析を鷲尾チームと連携して行い、得られた知見は超解像像からの機械学習を用いた細胞状態診断法の検討に利用する。

## (2) 顕著な成果

### <優れた基礎研究としての成果>

#### 1. 耐酸性蛍光タンパク質 Gamillus、rsGamillus の開発

概要：細胞内には、pH が 5 以下の酸性を示す細胞内小器官も多数存在するが、従来の蛍光タンパク質は pH 5 以下では蛍光を失うため、それらの酸性細胞内小器官内のイメージングを蛍光タンパク質で行うことは困難であった。本研究では、生理的 pH から酸性 pH に渡って明るい蛍光を発する蛍光タンパク質 Gamillus と、光スイッチング蛍光タンパク質 rsGamillus を開発した。これにより、幅広い細胞環境下における蛍光イメージングや超解像イメージングを可能にした。

#### 2. 多点走査型超解像顕微鏡の開発

概要：本研究で開発した多点走査型超解像顕微鏡は、3 次元高速超解像イメージング法として知られる Lattice light sheet 顕微鏡と同等の空間分解能を有し、かつ既存のパルスレーザーシステムとスピニングディスク顕微鏡を用いたシンプルな装置であり、画像取得後のポストプロセッシングも不要であるため、3 次元超解像顕微鏡としての実用性は高いと考えられる。

#### 3. 超解像イメージングにおける画像再構成計算法の開発

概要：細胞内タンパク質分子の時空間的分布構造の知見を導入し、超解像イメージを高精度に推定する手法開発に取り組んだ。その結果、構造正則化および  $L_p$  正則化技術を導入し、SPoD-ExPAN 超解像顕微鏡による超解像細胞状態時間発展を高精度に推定する手法を開発した。その結果、従来問題となっていた超解像イメージングにおけるアーティファクトの問題を解決した。

### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

#### 1. 1 分子局在顕微鏡超解像イメージングのための蛍光タンパク質 SPOON の開発

概要：従来の超解像イメージングは、2 つ以上の光源を用いた特殊な照明シーケンスが必要であり、観察には専門技術が必要であった。そこで、超解像観察を容易に行うための蛍光タンパク質 SPOON を開発した。SPOON では、1 波長の照明で蛍光発光と蛍光の明滅が可能であり、非常に簡単に 1 分子局在顕微鏡法による超解像観察が可能である。SPOON を用いることで、生命科学分野から医療創薬分野などの広い分野での超解像イメ

ージングの普及が見込まれる。

## 2. 細胞に優しい超解像イメージング技術 SPoD-OnSPAN の開発

概要：従来の主たる超解像イメージングである RESOLFT や 1 分子局在顕微鏡法は、観察に必要な極めて強い照明光で光毒性が発生するために生体試料の観察には適さない。また、弱い照明光で観察可能な構造化照明顕微鏡は、理論的な制約によって空間分解能が 100 nm 程度に留まる。研究で開発した SPoD-OnSPAN イメージング技術では、これらの問題点を解決し、RESOLFT や 1 分子局在顕微鏡法に比べて 1/100 以下のパワー密度となる 1 W/cm<sup>2</sup> 程度の照明光を用いながらも、80 nm 以下の高空間分解能を実現した。これにより、生命科学分野や医学創薬分野など幅広く超解像イメージングの利用が期待される。

## 3. 超高速画像再構成計算処理法 SPoD-Net 法の開発

概要：SPoD-OnSPAN や SIM 等の多くの超解像イメージングでは、対象観測の画像データから最適化計算を経て超解像画像を得る。しかし、従来の高速最適化手法である FISTA では画像再構成の計算量は非常に多い。本研究では、FISTA の超解像画像復元過程を 10 層程度の反復的全結合型畳み込みニューラルネットワークで近似し、一回のモデル計算でその復元過程をエミュレートする SPoD-Net 法を開発し、計算速度を 600 倍以上改善した。この手法は、様々な画像から原画像を高速で推定計算するのに有用であり、多方面での応用が期待される。

### < 代表的な論文 >

1. 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

概要：従来の光スイッチング蛍光タンパク質は酸性条件 (pH < 5) で蛍光強度が著しく低下するために、酸性の細胞内小器官の超解像イメージングは困難であった。本研究では、我々の開発した耐酸性蛍光タンパク質 Gamillus に対して試験管内分子進化を行うことにより、酸性条件に対して耐性の高い光スイッチング蛍光タンパク質 rsGamillus を開発した。本研究は、蛍光タンパク質によるエンドソーム、リソソーム、分泌顆粒等の酸性細胞内小器官の細胞学研究へ向けた超解像イメージングの展開に寄与するものである。

2. 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

概要：既存の超解像イメージングは、反復最適化アルゴリズムを用いるため膨大な計算時間を要する。これに対し、本研究では SPoD 超解像イメージングについて、超解像の直接高速推定が可能な深層学習ネットワーク SPoD-Net を提案した。一般の深層学習と異なり、SPoD-Net は超解像画像を用いずに低解像観測画像のみから効率的学習を行うことができ、かつ観測画像から直接推定するため、既存のイメージング方法よりも数百倍高速に超解像画像を推定できる。

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. 25(1), 014502 (2019).

概要: 3次元観察に用いられる2光子励起蛍光顕微鏡は、照明に用いる1点走査を多点走査に並列化することで、撮像速度を向上してきた。本論文では、従来の近赤外光より波長の短い可視光を用い、多点走査型2光子励起蛍光顕微鏡の空間分解能を向上した。理論計算と蛍光ビーズの実際の観察により、高い奥行き分解能を持つことを明らかにした。生きたHeLa細胞内のゴルジ体の3次元動態を高い奥行き分解能で、ボリュームあたり2秒の速さで観察した。

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ① 永井グループ

研究代表者:永井 健治(大阪大学産業科学研究所 教授)

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

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)

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 鷺尾グループ

主たる共同研究者:鷺尾 隆(大阪大学産業科学研究所 教授)

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) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

永井グループでは、CREST「次世代フォトニクス」領域の支援で本研究課題が開催した Oxford 大学での超解像イメージングワークショップを契機に共同研究を開始した英国 University College London の Henriques 研究室との共同研究を行っている。Henriques 研究室では、超解像イメージング手法の SRRF (Super resolution radial fluctuation) を開発している。当該共同研究では、Henriques 研究室で開発中の、超解像画像の忠実性とリアルタイム性を改良した LiveSRRF を用いて超解像生理機能イメージングを試みている。また、Einstein College of Medicine、Department of Anatomy & Structural Biology の Vladislav Verkhusha 教授の研究室と共同で、バクテリア由来のフイクロームおよびシアノバクテリオクロームを改変することで近赤外蛍光を示す超解像イメージング用蛍光プローブの開発を進めている。

研究代表者の永井は、2019年9月24～26日に宮崎市で開催された第57回日本生物物理学会年会の実行委員長を務め、国内外の研究者、当学会の協賛企業、そして宮崎県の地方自治体や地元企業と連携して、本年会の運営を行った。本年会においては、永井が産学官に渡るネットワーク形成に努めるとともに、当研究課題の研究参加者も出席してCRESTの研究成果を広く発信した。

藤田グループでは、独フリードリヒ・シラー大学イェーナの Rainer Heintzmann 教授と、超解像顕微鏡開発の共同研究を行った。レーザー走査型の顕微鏡法では、非線形蛍光応答による超解像イメージング法と検出信号量を増加できるイメージスキヤニング顕微鏡法を組み合わせた顕微鏡を開発し、2.5倍高い信号量の超解像イメージングを達成した。広視野照明の顕微鏡では、開発した構造化照明顕微鏡装置で取得された、画像から、超解像イメージを再構成するプログラムを開発した。また、英オックスフォード大学にて開催したワークショップがきっかけとなり、同大学の Booth 教授と共同研究を開始し、博士後期課程の学生1人に留学の機会を与えることができた。研究では、構造化照明顕微鏡に搭載する補償光学の原理確認を行い、実際に開発した装置に搭載した。

ネットワーク形成については、第43回、第44回レーザー顕微鏡研究会講演会を藤田克昌が会長として主催し、メンバーがCREST研究成果を発表した。本研究会では産業界や顕微鏡ユーザーとの繋がりがあり、開発した成果に関する多角的な議論を行った。また、東京で開催された The

24th General Congress of the International Commission for Optics (ICO-24)、および、大阪で開催予定だったがコロナ禍のため中止となった Focus on Microscopy 2020(アブストラクトのみ Web 掲載)においてもレーザー顕微鏡研究会と合同で企画し、CREST 研究成果を国内外に広く発信した。