

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
(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)
(1年追加支援により、2022年3月まで延長)

研究代表者：永井 健治
(国立大学法人大阪大学
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、生理機能の超解像イメージングを行う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用いる蛍光顕微鏡、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も成功した。また、極めて低いレベルの蛍光強度でノイズも含む観察画像から、大幅にノイズを低減して明瞭な画像を復元するデノイジング手法の開発にも成功した。

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、高時間分解能で超解像観察が可能な、高次非線形蛍光応答を利用したいくつかの超解像観察手法を開発した。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ることで、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。次に、構造化照明とライトシート照明を組み合わせたシートアクティブ型の構造化照明超解像顕微鏡 SPA-SIM を初めて開発し、生細胞の 3 次元超解像観察に成功した。さらに、二光子励起による非線形なライトシートアクティベーションを導入することで、従来の構造化照明超解像顕微鏡では観察が難しい試料内部の密な構造でも高空間分解観察が可能な超解像顕微鏡の開発に成功した。

超解像生理機能イメージングに向けて、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も 1 分子局在超解像観察が可能となる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、蛍光タンパク質として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、 Ca^{2+} を測定するため、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 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 Ca^{2+} プローブ sb-cameleon を開発した。温度を測定するプローブとして、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、青色光励起型レシオメトリック温度プローブ B-gTEMP、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、そして温度に対する高感受性とプローブの局在化が両立可能な温度プローブ gMELT を開発した。また、温度や Ca^{2+} 以外の生理機能測定のため、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。この手法により、酸化還元状態、ATP、NADPH といった一連の生理機能プローブのプロトタイプの作製を行った。また、SPoD-OnSPAN 顕微鏡で生理機能超解像イメージングを行うためのプローブとして、光スイッチング蛍光タンパク質と生理機能計測用プローブを組み合わせたハイブリッド型生理機能超解像プローブを開発した。

超解像生理機能イメージングは、 Ca^{2+} を中心に進め、 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 Ca^{2+} 変化の超解像観察に成功した。次世代フォトニクス領域の国際連携支援によって始まった University College London の Henrique 研との共同研究では、 Ca^{2+} プローブ ps-cameleon を LiveSRRF 超解像イメージングによって観察を行うことで、ヒスタミン刺激による Ca^{2+} 振動の検出に成功した。また、ハイブリッド型生理機能超解像プローブの SPoD-OnSPAN 観察によって構造超解像観察と生理機能超解像観察を行う生理機能超解像イメージング手法の開発を行った。これにより、 Ca^{2+} と細胞骨格の超解像画像を同時に取得することが可能であることを確認した。

細胞内熱産生メカニズム研究では、チャン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、実験的・理論的に検証した。実験的なアプローチからは、光刺激でチャンネル電流発生を制御可能なチャン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、チャンネル電流発生にともなう温度変化の同時観察を行った。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を行い解析することで、細胞内の熱伝導係数が水の値の 1/6 となる $0.1 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$ という推定値を得た。一方、理論的なアプローチからは、チャンネルタンパク質におけるジュール熱発生とその周囲への温度拡散の計算機実験を行った。その結果、細胞内のチャンネルタンパク質分子集団からのジュール熱により、細胞内温度が 1°C 程度上昇する可能性があることを明らかにした。

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た。通常の光学顕微鏡の 1000 倍にもおよぶ超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・透過像を取得した。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、明視野透過像から細胞の酸化ストレス耐性を予測した。永井チームでは以前、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した。鷲尾チームと連携し、この可視化データを用いて、細胞群の明視野撮影画像から重要な生理機能である酸化ストレス応答を示す細胞の分布画像を算出する手法の開発に取り組み、機械学習を用いた手法によって超解像画像から細胞状態診断を行う実現性を確認した。さらに、細胞小器官レベルの情報を含めたより高精度な細胞状態の解析手法構築を行い、トランススケールスコープでのミトコンドリアの蛍光観察によって、HeLa 細胞約 100,000 個に含まれるミトコンドリアを同時観察することに成功した。これには数億~数十億のミトコンドリアの情報が含まれていると概算できる。このような観察画像にデコンボリューションを行うことにより、この手法が細胞小器官の形状識別に有効である可能性を確認した。

(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^2 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-OnPAN 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 ($\text{pH} < 5$) 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, Toshiaki 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 鷲尾グループ

主たる共同研究者: 鷲尾 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ト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。