

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14487

研究課題名(和文) フレネル非干渉光相関ホログラムに基づく化学発光超解像高速3Dイメージング法の確立

研究課題名(英文) Real time three dimensional imaging of chemiluminescence with Fresnel incoherent correlation holography

研究代表者

永井 健治 (Nagai, Takeharu)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：20311350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：化学発光タンパク質と、フレネル非干渉光相関ホログラム顕微鏡法(FINCH)、波面収差補正系を応用することで、高速・3次元・超空間分解の像を得る“超解像発光ホログラム顕微鏡”構築に向けて研究を行った。発光タンパク質Nano-lanternを発現するHeLa細胞をFINCHで観察することで、蛍光と同等程度の化学発光の断層像を観察することができた。光の収差による像の歪みを補正するための、波面補正光学システム構築し、その有用性を評価した。高い時間分解能・多色で化学発光ホログラムを取得するために、Nano-lanternの10倍明るいeNano-lanternとその波長変異体の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：We proceeded experiment toward development of “Superresolution chemiluminescence holographic microscopy” enabling chemiluminescence image acquisition with high speed, three-dimension and superresolution quality, by applying chemiluminescent protein with Fresnel incoherent correlation holography (FINCH) and wavefront correction system. By observing HeLa cells expressing chemiluminescent protein “Nano-lantern” using FINCH, we could reconstruct the chemiluminescent tomographic images with as good quality as the fluorescence ones. To correct wavefront distortion of light, we constructed a wavefront correction system and evaluated the superior performance. To achieve high speed and multi-color acquisition of the chemiluminescent holograms, we developed color palettes of chemiluminescent protein “eNano-lantern” with approximately 10-fold improvement in the brightness compared with previous Nano-lantern.

研究分野：生物物理学

キーワード：化学発光 ホログラフィー 超解像顕微鏡 イメージング 3次元

1. 研究開始当初の背景

化学発光を用いた細胞観察は、蛍光観察に必須である励起光照射を要しないため、光毒性や自家蛍光を排除できる、光遺伝学(オプトジェネティクス)と併用できる、など様々な利点をもつ。従来の化学発光プローブは蛍光プローブに比べて圧倒的に暗くライブイメージングに適していなかったが、近年我々は発光強度を劇的に向上させた Nano-lantern (Saito ら, Nat. Commun. 3, 1262, 2012) の開発に成功し、ビデオレート(30 枚/秒)でのイメージングを可能にした。しかしながら、化学発光を用いた観察では、サンプルを励起する照明光学系が存在しないため、共焦点走査型顕微鏡法のように光学断面像を取得し三次元観察を行うことや、構造化照明等を利用して光の回折限界を超えた超解像イメージングを行うことが難しかった。

2. 研究の目的

本研究では発光試料から射出された光のみで、走査することなく 3 次元光学断面像を得ることが可能なフレネル非干渉光相関ホログラム (FINCH) 法を応用した、三次元発光イメージングシステムの開発を行った。FINCH 法は Brooker らにより発明された技術であり (Brooker ら, Optics Lett, 32, 8, 2007, Nat. Photon. 2, 190, 2008)、試料から射出される光を空間光変調器で 2 分岐させ CCD 等の 2 次元検出器上でその干渉パターン(ホログラム)を記録し、数値計算により 3 次元像を超分解能 (~100 nm) で再生することができる (図 1 上)。これに、波面収差補正光学系を組み合わせることで更なる分解能を向上させ、最終的に高速 (ミリ秒)・3 次元・超分解 (50 nm)・光学断面 (<100 nm) 像を得る“超解像発光ホログラム顕微鏡 (SR-BLINCH)”の開発を目的とした (図 1 下)。

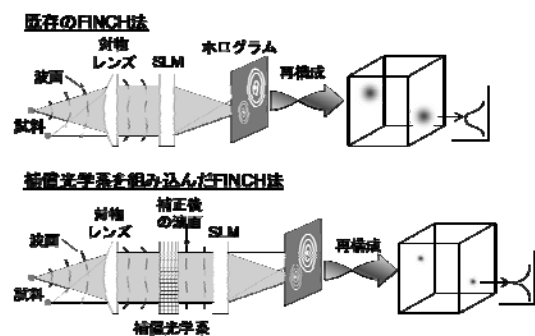


図 1. 発光超解像ホログラムの光学系概念図

3. 研究の方法

初めに、連携研究者の Brooker 博士が開発した FINCH 光学系において、化学発光を用いた三次元イメージングが可能かについて検討を行った。次に Shack-Hartmann 波面セン

サーと空間光変調器を組み込んだ顕微鏡光学系を作成し、波面収差補正による結像特性の評価を行った。その波面収差補正系を組み込んだ FINCH 光学系をデザインし、その構築を目指した。FINCH 光学系作成に当たっては、ホログラフィー顕微鏡の開発・研究を行っている田原樹博士 (関西大学) に研究協力をいただいた。

また、時間分解能よく・複数波長の化学発光ホログラム画像を取得するために、Nano-lantern の発光強度を超える化学発光タンパク質を複数色開発することにも着手した。

4. 研究成果

(1) FINCH 光学系を用いた化学発光イメージングの検討

蛍光タンパク質とウミシイタケルシフェラーゼのハイブリッドタンパク質である Nano-lantern を HeLa 細胞に発現させ、FINCH 光学系による観察を行った。蛍光によるホログラムの観察を行った後、化学発光において同等程度の画像取得が可能であることを確認した。(図 2?)。本データは化学発光タンパク質を用いてホログラム撮影をした世界初の例となる。

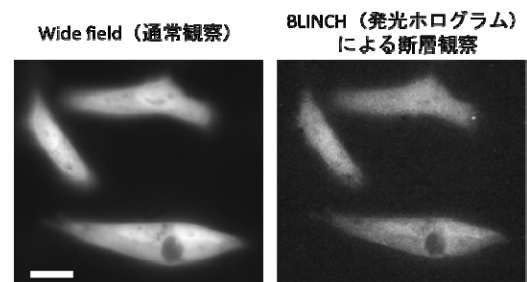


図 2. 既存の FINCH 光学系による、化学発光のホログラム断面観察例。(左) 通常の化学発光観察。(右) ホログラムによる断面観察。(スケールバー: 10 μm)

(2) 波面収差補正光学系の開発

波面収差補正による結像特性を評価するために、(図 3 上) で示す顕微鏡光学系を作成した。無限補正の 10 倍の対物レンズ、補償光学系としてガイドスターとして 635nm のダイオードレーザー、波面収差を検出するための Shack-Hartmann 波面センサー、そして波面補正のための空間光変調器を組み込んだ。Shack-Hartmann 波面センサーで、顕微鏡光学系を通過したプローブ光の波面を計測し、その波面の位相情報に基づいて空間光変調器を操作することで、波面収差補正を行った。このシステムを評価したところ、波面補正がない顕微鏡像に対し、波面収差補正によって結像特性が改善された顕微鏡像を得ることができた (図 3 下)。

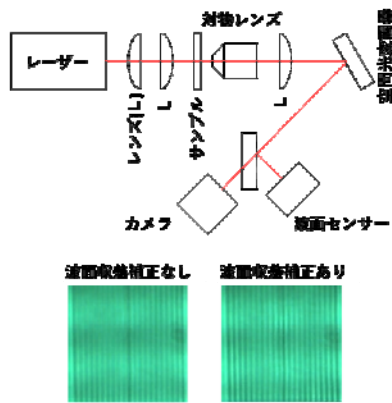


図 3. (上) 補償光学系を有する顕微鏡光学系。(下) 波面収差補正なし・ありのテストターゲットの像。(スケールバー: 50 mm.)

(3) 補償光学系を組み込んだ FINCH 光学系のデザイン

図 4 の通り、光学系のデザインを行った。空間光変調器を用いて、発光試料から射出する光の半分を平面波に、もう半分を球面波に変調させ、平面波と球面波の干渉縞パターン（ホログラム）を高感度 CCD カメラで記録する。空間光変調器と光学的共役な位置に Shack-Hartmann 波面センサーを置き、空間光変調器上での波面の歪みを測定し、その情報を空間光変調器に転送し、歪みを補正するような変調パターンを反映させる。このフィードバックループを繰り返すことで、分解能の向上を図る。波面補償用のガイドスターとして、オートフォーカス時に使用する近赤外光を利用する。近赤外光が発光観察時のノイズとならないように、オートフォーカスをカメラの露光時間と露光時間の間に行う系を開発した。現在この光学系構築とプログラム開発をおこなっているところである。

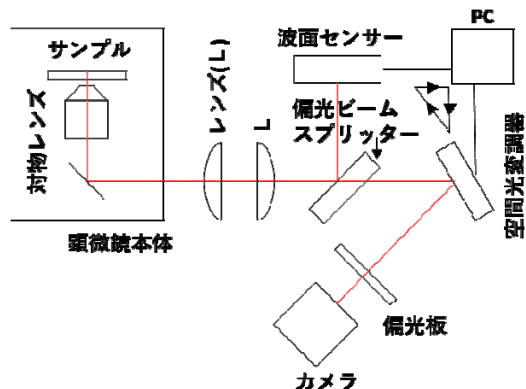


図 4. 補償光学系を有する FINCH 光学系のデザイン。波面センサーにより空間光変調器上の波面の乱れを検出し補正が可能。

(4) 高光度発光タンパク質の開発

近年発表された高光度青色発光タンパク質 NanoLuc (NLuc) と蛍光タンパク質を融合させ、タンパク質間のフォルスター共鳴エネルギー移動を高効率で誘導することにより、従来の Nano-lantern の約 10 倍の発光強度をも

つ eNano-lantern (eNL) を開発した。顕微鏡下において 1 分子の検出が可能に輝度が高い。さらに、融合する蛍光タンパク質の色の組み合わせを複数試すことで、eNL の多色化にも成功した（シアン：CeNL、緑：GeNL、黄：YeNL、橙：OeNL、赤：ReNL）。 Ca^{2+} センシングドメインと融合することで、化学発光 Ca^{2+} センサーの作成にも成功した。（Suzuki ら、Nat. Commun. 2016）。

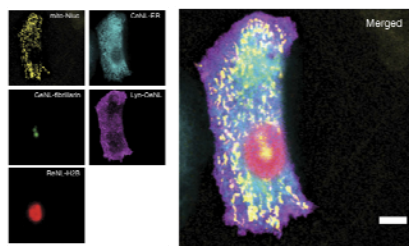
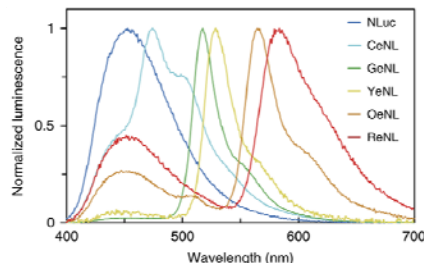


図 5. (上) eNano-lantern (eNL) シリーズの発光スペクトル。(下) eNL を発現した HeLa 細胞における、5 色同時 wide-field 発光イメージング画像。

以上の結果より、FINCH 光学系と高光度 Nano-lantern を組み合わせることで、高い空間分解で発光三次元観察できることが明らかになった。波面収差補正を組み込んだ顕微鏡光学系が鮮明な物体像を結像させたことから、その FINCH 光学系への応用の可能性をさぐる事ができた。以上の FINCH 光学系と波面収差補正、収差の補正計算プログラム等組み合わせることは今後の課題である。

化学発光プローブの面では、可視光全域を網羅する 5 色の eNL を開発に成功した。将来的には、高い時空間分解能・マルチカラーのホログラム三次元発光イメージングや、 Ca^{2+} などの動きの早い機能的生体分子の三次元動態解析が可能になることが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Suzuki K, Kimura T, Shinoda H, Bai G, Daniels M, Arai Y, Nakano M, Nagai T, Five color variants of bright luminescent protein for real-time multicolor bioimaging, Nature Communications, 査読有, 7, 2016, 13718 (Article number) 10.1038/ncomms13718

[学会発表] (計 14 件)

- ① Takeharu Nagai, Super-duper chemiluminescent proteins applicable to wide range of bioimaging, SPIE. Photonics West 2017, SPIE BiOS, 2017 年 1 月 28 日, The Moscone Center (San Francisco, USA)
- ② 新井由之, 収差を利用した化学発光 3 次元イメージング法の開発, 定量生物学の会第 8 回年回, 2017 年 1 月 8 日, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市)
- ③ Takeharu Nagai, Bioluminescent probes capable of video rate functional imaging at various spatial level ranging from single cell to whole body, FASEB Calcium and Cell Function, 2016 年 6 月 13 日, Lisbon Marriott Hotel (Lisbon, Portugal)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 健治 (NAGAI TAKEHARU)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号: 20311350

(4) 研究協力者

Gary Brooker
Johns Hopkins 大学・Biomedical Engineering・教授

田原 樹 (TAHARA ITSUKI)
関西大学・システム理工学部・助教
研究者番号: 50709095