

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05226

研究課題名(和文) 蛍光偏光と蛍光強度揺らぎに基づく高生体適合性超解像イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of highly-biocompatible super-resolution imaging based on fluorescence polarization and fluctuation

研究代表者

和沢 鉄一 (Wazawa, Tetsuichi)

大阪大学・産業科学研究所・特任准教授

研究者番号：80359851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：従来の蛍光顕微鏡をベースとした多くの超解像イメージング法は、非常に強い照明光で試料を照射する必要があり、生体試料の観察において光毒性がしばしば問題になってきた。筆者は、光毒性の問題の解決へ大きく前進した超解像イメージング法であるSPoD-OnSPANを最近開発した。しかし、SPoD-OnSPANは蛍光偏光を利用しているため、様々な角度の蛍光プローブが集中する蛍光物体ではしばしば高空間分解能観察が困難であった。本研究では、この問題を解決するため、蛍光強度揺らぎの高次統計量計算とSPoD-OnSPANを組み合わせた新しい超解像イメージング法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SPoD-OnSPAN超解像顕微鏡は、STED、RESOLFT、SIMといった高度で特化した顕微鏡装置が必要な手法とは異なり、かなりシンプルな光学系を有している。しかし、従来のSPoD-OnSPANでは、蛍光異方性が低い蛍光物体の高空間分解能化が難しいこと、そして画像再構成にかなり長い計算時間を要した。ところが、本研究課題で開発した手法では、これらの問題を解決していると思われる。今後、本研究で得られた成果をさらに発展させることにより、超解像イメージングがより一層広く生命科学研究で利用されることに本研究の成果が資するものと期待する。

研究成果の概要(英文)：In conventional super-resolution imaging involving fluorescence microscopy, a sample is needed to be irradiated at a considerably high power density, which leads to a serious problem of phototoxicity in cells especially when observing a live sample. To largely mitigate the phototoxicity, we recently developed a super-resolution imaging technique SPoD-OnSPAN. However, because fluorescent objects to be observed by SPoD-OnSPAN in principle need to exhibit fluorescence polarization, high resolution observation of a fluorescent object which contains many fluorescent probes with various orientations has been difficult. To solve this problem, this study has newly developed a super-resolution imaging technique that combines SPoD-OnSPAN and higher-order statistics of fluorescence fluctuation.

研究分野：生物物理学

キーワード：超解像イメージング 蛍光顕微鏡 光スイッチング蛍光タンパク質 蛍光偏光 cumulant

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の超解像顕微鏡法の開発により、光学顕微鏡の空間分解能の理論限界である光の回折限界 (~200 nm) を超えた高空間分解能観察が蛍光顕微鏡で実現している。これまでに開発された主要な超解像顕微鏡法には、STED 等を含む RESOLFT [1]、PALM や STORM を含む 1 分子局在顕微鏡法 (SMLM) [2]、構造化照明顕微鏡法 (SIM) [3]、そして超解像光学的揺らぎイメージング法 (SOFI) [4] が挙げられる。ところが、これらの超解像顕微鏡法では、

- 観察に用いる照明光のパワー密度と光毒性の発生
- 観察可能な蛍光プローブ密度
- 実現可能な空間分解能

の間にトレード・オフがあり、これら全ての項目に優れている手法は現状では存在しない。むしろ、観察目的に応じて適した手法を選択して用いるのが現状である。STED、RESOLFT、そして SMLM では高空間分解能が得られるが、観察試料に対して 1 kW/cm² 以上の極めて強い光を照射する必要があり、生きた細胞や組織において光毒性の発生が問題となっている。したがって、強い照明光の照射は、蛍光プローブの褪色のみならず、観察下の生体試料に様々な異常やアポトーシスを誘起したりする。また、SIM は強い照明光を必要としないが、空間分解能は 100 nm を超えることが原理的に困難である。

筆者らは、最近、新規超解像イメージング手法の開発に取り組み、極めて弱い照明光 (~1 W/cm²) を用いるにもかかわらず、SIM よりも良好な 70 nm の空間分解能の超解像観察を実現した、SPoD-OnSPAN (super-resolution polarization demodulation/on-state polarization angle narrowing) という超解像イメージング手法を開発した [5]。これは、蛍光偏光顕微鏡観察と正則化最尤法にもとづく画像再構成計算による超解像イメージング手法である SPoD-ExPAN [7] を改変し、極めて低い光毒性での観察を可能にした手法である。確かに、SPoD-OnSPAN には低光毒性という利点はあったが、蛍光試料中で様々な配向の蛍光プローブが高密度で集中するような部位においては、高空間分解能の観察が難しいという問題点があった。

2. 研究の目的

前節の背景を踏まえて、本研究は、低強度照明光かつ比較的高い蛍光プローブ密度の条件で高空間分解能の超解像観察が可能なイメージング技術の開発を行うことを目的とする。これを実現するため、低光毒性に向けた弱い照射光による超解像イメージングである SPoD-OnSPAN 手法をベースとして、蛍光プローブが高密度で存在する蛍光物体に対しても超解像画像を取得できるような新規超解像イメージング技術を開発する。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために実施する具体的な研究項目は、以下の通りである：

- 光毒性の低い超解像超解像イメージングに向けた、光スイッチング蛍光タンパク質の開発
- SOFI の原理を取り入れた SPoD-OnSPAN 超解像イメージング法の開発

(1) 光スイッチング蛍光タンパク質の開発とその特性解析

本項目では、明るい蛍光と速い光スイッチングを示す光スイッチング蛍光タンパク質を開発した。ここでは、SPoD-OnSPAN で使われた光スイッチング蛍光タンパク質である Kohinoor [8] をテンプレートとしてランダム変異の導入とスクリーニングを繰り返すことで、良好な特性を示すものを得た。さらに、得られた光スイッチング蛍光タンパク質を、光物理学、光化学、そして物理化学的手法を用いて解析した。

(2) SOFI の原理を取り入れた SPoD-OnSPAN 超解像イメージング

本項目では、SPoD-OnSPAN 超解像顕微鏡による観察において、SOFI (super-resolution optical fluctuation imaging) [4] の観察手法を検討する。SOFI は、蛍光顕微鏡のタイムラプス観察で取得された画像データにおける、各画素の蛍光強度の強度揺らぎから、高次統計量の一つであるキュムラントを用いて高解像度化する手法である。したがって、本研究では SPoD-OnSPAN 超解像顕微鏡で得られる画像データと高次キュムラントとの適合性を検討した。

4. 研究成果

(1) 光スイッチング蛍光タンパク質の開発とその特性解析

低光毒性の超解像イメージングに向けた光スイッチング蛍光タンパク質は、明るい蛍光と速い光スイッチングを示すことが望ましい。このために、従来 SPoD-OnSPAN に用いられてきた光スイッチング蛍光タンパク質である Kohinoor [8] をテンプレートとしてランダム変異導入を含む試験管内分子進化を行い、Kohinoor 2.0 [9] を開発した。Kohinoor と比較すると、Kohinoor 2.0 は、2.6 倍高い蛍光強度 (図 1) と 1.5 倍速いオフスイッチング (蛍光明状態 暗状態への遷移)

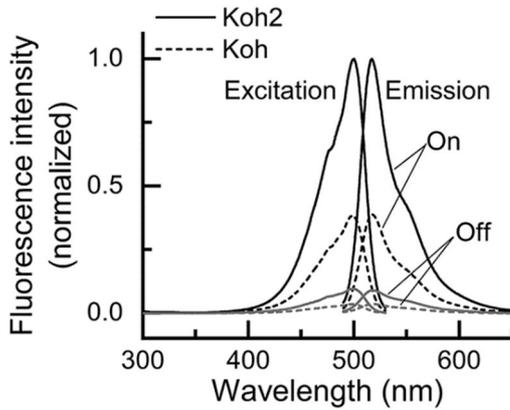


図1 . Kohinoor 2.0 および Kohinoor の蛍光スペクトル。比較のため、同じ濃度で測定したものを示した。Koh2: Kohinoor 2.0; Koh: Kohinoor。

速度を示した。ただし、オンスイッチング(蛍光暗状態 明状態への遷移)の速度は、Kohinoor とほぼ同じであった。

Kohinoor 2.0 での蛍光強度改善の原因を調べるため、Kohinoor 2.0 および Kohinoor の物理化学的な解析を行った。Kohinoor 2.0 を含む緑色蛍光タンパク質では、その発色団に含まれるチロシン由来のフェノール基の解離が重要であるので、Kohinoor 2.0 と Kohinoor の pH 滴定測定を行った(図2)。その結果、Kohinoor 2.0 および Kohinoor では、発色団フェノール基の水素イオンの結合解離は、単純な2状態遷移ではなく、解離の pK_a 値は、1個でなく3個の値に開裂することが明らかになった(図3)。発色団フェノール基の pK_a の解析値の詳細を見ていくと、Kohinoor から Kohinoor 2.0 を得るにあたって導入したアミノ酸変異は、中性 pH においてイオン化型発色団フェノール基を安定化させることに作用しており、これが Kohinoor 2.0 の明るい蛍光強度に寄与していることが分かった。以上の結果は、蛍光タンパク質の蛍光強度改善においては、吸光や蛍光の pH 依存性の解析が有用である可能性を示唆している。

さらに、明るい蛍光を示す Kohinoor 2.0 の超解像イメージングで有用性を実証するため、長時間の超解像イメージングを行った。Kohinoor 2.0 や Kohinoor の発現量の指標となるように、Kohinoor 2.0 あるいは Kohinoor に、P2A 配列を介して mCherry が発現するための遺伝子を構築し、COS7 細胞中で発現させた。図4には、mCherry チャンネルではほぼ同等の蛍光強度を示す HeLa 細胞を観察中に選択し、SPoD-OnSPAN 超解像観察を長時間にわたって行った観察画像データである。図4に示すように、Kohinoor 2.0 では、Kohinoor よりも長時間にわたって超解像観察が可能であることが示すことができた。

(2) SOFI の原理を取り入れた SPoD-OnSPAN 超解像イメージング

本項目では、タイムラプス SPoD-OnSPAN 観察で得られた蛍光画像の時系列より、キムラント画像を算出することで超解像画像替えら得るかどうか feasibility を検討した。SPoD-OnSPAN 観察では偏光面が絶えず回転する偏光照明で変調を掛けるので、観察下の蛍光試料の変調された蛍光 $m(t)$ は、

$$m(t) \propto \sin^2(t)$$

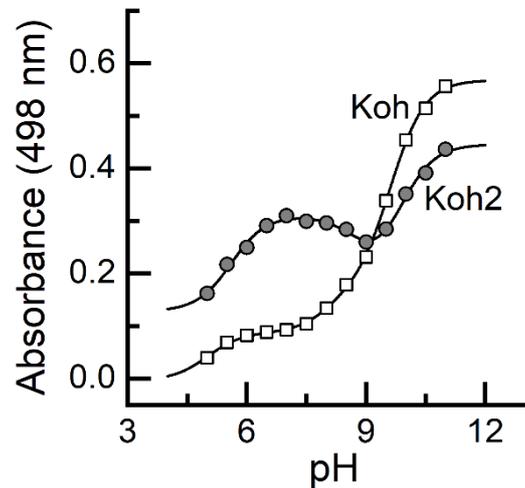
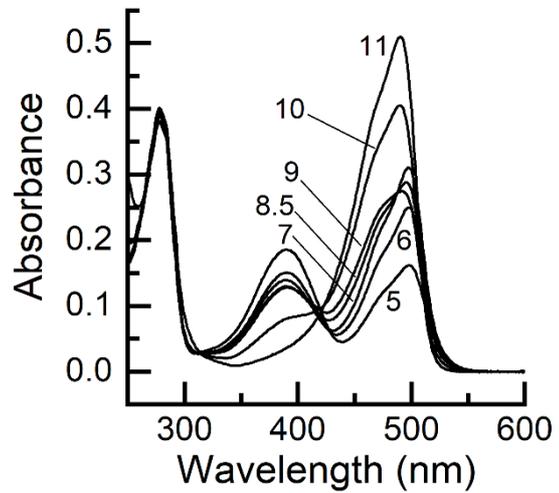


図2 . Kohinoor 2.0 および Kohinoor の吸光スペクトル(上)及び吸光度の pH 依存性(下)。(下)パネルの曲線は、図3のモデルにモデルを用いてプロットした。

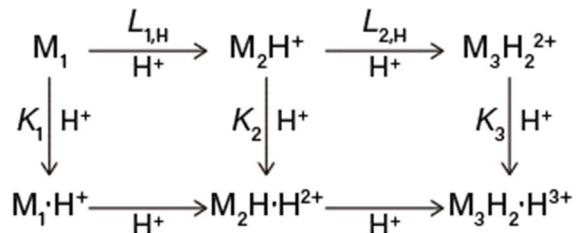


図3 . Kohinoor 2.0 および Kohinoor の発色団のプロトン解離モデル。

の形を取る。蛍光強度 x の確率密度関数 $f(x)$ は、

$$f(x) = \frac{2}{\pi\sqrt{1-(1-2x)^2}}$$

の形を取る。これを用いて高次キュムラントを計算した結果を図5に示す。この計算結果より、SPoD-OnSPANの観察データでは、偶数次のキュムラント画像が非ゼロの値を示すことが分かった(図5)。ここで得られた知見を元に、SPoD-OnSPAN 観察のシミュレーション画像を用いて、6次のキュムラント画像を算出したところ、超解像画像が得られることを確認できた(図6)。

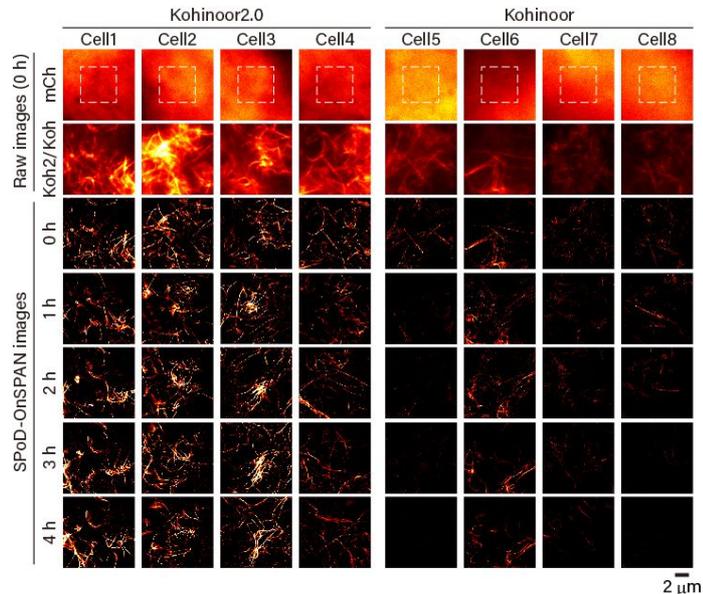


図4 . Kohinoor 2.0 および Kohinoor を発現した COS7 細胞の超解像観察。Raw images の行は、広視野蛍光画像。SPoD-OnSPAN images の行は、超解像イメージングによる画像。

(3)今後の展望

SPoD-OnSPAN 超解像顕微鏡は、STED、RESOLFT、SIM といった高度で特化した顕微鏡装置が必要な手法とは異なり、かなりシンプルな光学系を有している。しかし、従来の SPoD-OnSPAN では、蛍光偏光度が低い蛍光物体の高空間分解能化が難しいこと、そして画像再構成にかなり長い計算時間を要した。ところが、本研究課題で開発した手法では、これらの問題を解決していると思われる。今後、本研究で得られた成果をさらに発展させることにより、超解像イメージングがより一層広く生命科学で利用されることに資するものと期待する。

<引用文献>

- [1] Eggeling et al (2015) Q. Rev. Biophys. 48: 178-243.
- [2] Huang et al (2009) Annu. Rev. Biochem. 78: 993-1016.
- [3] Gustafsson (2000) J. Microsc. 198: 82-87.
- [4] Dertinger et al (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 10: 22287-22292.
- [5] Wazawa et al (2018) Microscopy, 67: 89-98.
- [6] Wazawa et al (2020) NeuroMethods, 154: 229-244.
- [7] Hafi et al (2014) Nat. Methods. 11: 579-584.
- [8] Tiwari et al (2015) Nat. Methods, 12: 515-518.
- [9] Wazawa et al (2021) Microscopy 70:340.

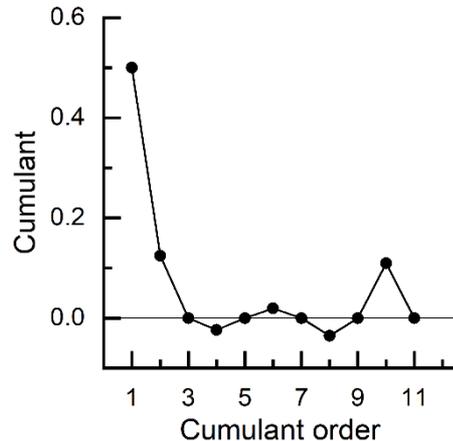


図5 . SPoD-OnSPAN における蛍光強度変調の高次キュムラント

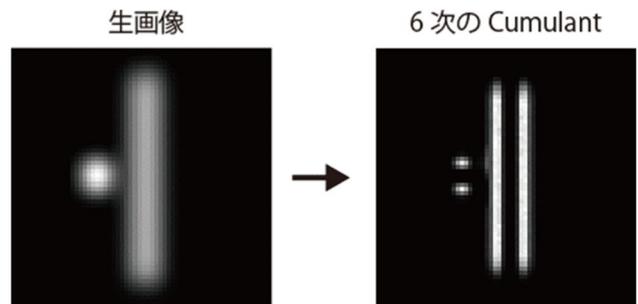


図6 . SPoD-OnSPAN のシミュレーション画像と、その6次キュムラント画像。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wazawa Tetsuichi, Noma Ryohei, Uto Shusaku, Sugiura Kazunori, Washio Takashi, Nagai Takeharu	4. 巻 70
2. 論文標題 A photoswitchable fluorescent protein for hours-time-lapse and sub-second-resolved super-resolution imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 340 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfab001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wazawa Tetsuichi, Washio Takashi, Nagai Takeharu	4. 巻 154
2. 論文標題 Highly Biocompatible Super-resolution Imaging: SPoD-OnSPAN	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroinformatics	6. 最初と最後の頁 229 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0532-5_11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Itoh Yukino, Hattori Mitsuru, Wazawa Tetsuichi, Arai Yoshiyuki, Nagai Takeharu	4. 巻 6
2. 論文標題 Ratiometric Bioluminescent Indicator for Simple and Rapid Diagnosis of Bilirubin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 889 ~ 895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.0c02000	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 和沢鉄一, 鷲尾隆, 永井健治	4. 巻 30
2. 論文標題 回転偏光照明蛍光顕微鏡と光スイッチング蛍光タンパク質を用いた超解像イメージング法: SPoD-OnSPAN	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 光アライアンス	6. 最初と最後の頁 15-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara, S., Chen, W., Washio, T., Wazawa, T., Nagai, T.	4. 巻 101
2. 論文標題 SPoD-Net: Fast recovery of microscopic images using learned ISTA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PMLR	6. 最初と最後の頁 694-709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinoda Hajime, Lu Kai, Nakashima Ryosuke, Wazawa Tetsuichi, Noguchi Kosuke, Matsuda Tomoki, Nagai Takeharu	4. 巻 26
2. 論文標題 Acid-Tolerant Reversibly Switchable Green Fluorescent Protein for Super-resolution Imaging under Acidic Conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1469 ~ 1479.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2019.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Vu Cong Quang, Fukushima Shun-ichi, Wazawa Tetsuichi, Nagai Takeharu	4. 巻 11
2. 論文標題 A highly-sensitive genetically encoded temperature indicator exploiting a temperature-responsive elastin-like polypeptide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96049-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hattori Mitsuru, Sugiura Nae, Wazawa Tetsuichi, Matsuda Tomoki, Nagai Takeharu	4. 巻 93
2. 論文標題 Ratiometric Bioluminescent Indicator for a Simple and Rapid Measurement of Thrombin Activity Using a Smartphone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 13520 ~ 13526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.1c02396	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Noma, R., Wazawa, T., Uto, S., Sugiura, K., Nagai, T.
2. 発表標題 Photoswitchable fluorescent protein with multiple equilibria states enables super-resolution imaging of intracellular dynamics.
3. 学会等名 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和沢鉄一, 野間涼平, 宇土周作, 杉浦一徳, 鷺尾隆, 永井健治
2. 発表標題 生細胞のタイムラプス超解像イメージングのための光スイッチング蛍光タンパク質
3. 学会等名 日本顕微鏡学会・第63回シンポジウム「顕微鏡オンラインフォーラム 2020」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和沢鉄一, 野間涼平, 宇土周作, 杉浦一徳, 鷺尾隆, 永井健治
2. 発表標題 新規光スイッチング蛍光タンパク質Kohinoor 2.0による超解像イメージング
3. 学会等名 日本顕微鏡学会・第76回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野間 涼平, 和沢 鉄一, 宇土 周作, 杉浦 一徳, 鷺尾 隆, 永井 健治
2. 発表標題 光スイッチング蛍光タンパク質「Kohinoor2.0」による、細胞内小器官動態の長時間/高速超解像イメージング
3. 学会等名 第29回日本バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wazawa, T., Uto, S., Sugiura, K., Maeda, S., Fujita, K., Washio, T., Nagai, T.
2. 発表標題 Development of a highly-bright positively reversibly photoswitchable fluorescent protein Kohinoor 2.0 for super-resolution microscopy
3. 学会等名 Annual meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和沢鉄一, 杉浦一徳, 鷺尾 隆, 永井健治
2. 発表標題 回転偏光照明, ポジティブ光スイッチング蛍光タンパク質, そして Lp 正則化画像再構成を用いた超解像イメージング: SPoD-OnSPAN.
3. 学会等名 第44回レーザー顕微鏡研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和沢鉄一, 野間涼平, 杉浦一徳, 鷺尾隆, 永井健治
2. 発表標題 光スイッチング蛍光タンパク質と偏光照明を用いた細胞に優しい超解像イメージング
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第42回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wazawa, T., Noma, R., Sugiura, K., Nagai, T.
2. 発表標題 Interplay of protonations at chromophore and non-chromophore sites plays a key role in the photo-properties of fluorescent proteins.
3. 学会等名 日本生物物理学会第59回年会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	永井 健治 (Nagai Takeharu) (20311350)	大阪大学・産業科学研究所・教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------