

# 遺伝子工学的に開発した蛍光プローブによる細胞生理機能超解像イメージング

Superresolution imaging of cellular functions using genetically-engineered fluorescent proteins

和沢 鉄一 新井 由之 河原 吉伸 中野 雅裕 鷲尾 隆 永井 健治  
Tetsuichi Wazawa Yoshiyuki Arai Yoshinobu Kawahara Masahiro Nakano Washio Takashi Takeharu Nagai

大阪大学産業科学研究所

The Institute for Scientific and Industrial Research, Osaka University

Recently-developed superresolution microscopy techniques have enabled us to visualize minute details of cells. However, conventional superresolution microscopy needs to illuminate cell samples at a power density of as high as  $10^2$ - $10^6$  W/cm<sup>2</sup>, which leads to phototoxicity to cells and in turn serious difficulties with observations of live cells. Herein, we have overcome the problem so that we have developed a technique of superresolution microscopy that is operable at an illumination power density of  $10^0$  W/cm<sup>2</sup>. This work would push the limit of superresolution microscopy to time-lapse imaging of live cells without damaging them.

## 1. 序論

従来の光学顕微鏡の空間分解能は、理論的には光の回折限界で決まり、実際の可視光用の高性能光学顕微鏡の分解能はだいたい 200 nm 止まりである。このような分解能上の制約はあるものの、光学顕微鏡は、細胞や組織を生きたまま経時的に観察できるため、生命科学における必須の研究ツールとして広く使われている。しかし、細胞の中には、小器官やタンパク質等の微小な機能単位が多数含まれており、様々な細胞プロセスにおいてそれらがどのように協調して働いているかという詳細を従来型光学顕微鏡で可視化することは難しい。

近年、蛍光顕微鏡に関しては、光の回折限界を超えた分解能をもつ超解像顕微鏡の開発が進んでいる。主たる超解像顕微鏡法としては、RESOLFT (reversible saturable/switchable optical linear fluorescence transitions), SMLM (single molecule localization microscopy), そして SIM (structured illumination microscopy) が知られている[Egging 2015]。特に SMLM, SIM では、画像再構成計算が超解像画像を求めるための必須構成要素となっている。また、RESOLFT や SMLM では、100 nm 以下の高い空間分解能を達成しているが、その反面、 $10^2$ - $10^6$  W/cm<sup>2</sup> もの極めて強いパワー密度で試料を照明する必要がある[Uno 2015]。この強い照明光が細胞に対して毒性となり、細胞の形態異常や細胞死等の様々なアーテファクトを引き起こすことが知られている。このため、従来の超解像顕微鏡法では、照明光による悪影響が少なく生きたまま細胞や組織の時間変化を高分解能で観察(タイムラプス観察)することが困難であった。

本稿では、我々が開発した細胞に優しい生体適合性の高い超解像顕微鏡技術について報告する。我々の超解像顕微鏡技術は、通常の蛍光顕微鏡と蛍光偏光を組み合わせた超解像顕微鏡法である SPoD-ExPAN(superresolution by polarization demodulation-excitation angle narrowing)法[Hafi 2014]を改良・拡張することで開発した。SPoD 法および SPoD-ExPAN 法では、顕微鏡観察下の全視野をカメラ撮影するので、視野全範囲の超解像観察を比較的速いフレームレートで行うことが可能であることが特徴であり、生きた細胞のタイムラプス超解像観察への利用が期待されている。しかし、従来の SPoD-ExPAN 法では、

STEDと同様に  $10^6$  W/cm<sup>2</sup>もの強い照明光が必要だったところ、我々が開発した高速光スイッチング蛍光タンパク質である Kohinoor[Tiwari 2015]を蛍光プローブに用いることで、 $10^0$  W/cm<sup>2</sup>というきわめて弱い照明光強度で超解像観察を可能にした。

この SPoD-ExPAN 法も、超解像画像を得るのに再構成計算が必要である。ところが、Kohinoor を蛍光プローブとして使って様々な生きた細胞試料の SPoD-ExPAN 超解像観察を試みたところ、再構成計算法で使用している L1 正則化最尤推定に起因するところのアーテファクトがしばしば現れることが分かった。この問題点を解決するために、従来の SPoD-ExPAN の再構成計算で使われていた超解像画像を求める最尤推定の L1-正則化を Lp-正則化へ拡張したところ、アーテファクトが少なく、より正確な超解像画像の再構成を実現している。

## 2. SPoD-ExPAN 超解像イメージング

### 2.1 SPoD-ExPAN 超解像イメージングの原理

顕微鏡観察の超解像化に必要な要素は、(1)近接した蛍光物体同士を分解・検出すること、そして(2)顕微鏡で撮像した画像のボケを解消するとともに、検出した個々の蛍光物体を画像上に分解して表示することである。SPoD 法および SPoD-ExPAN 法では、従来の超解像顕微鏡技術とは異なる方式でこれらの要素を実現している。

#### (1) SPoD 法の原理

SPoD 法では、近接した蛍光物体の分解検出には、励起光として直線偏光かつその偏光面が一定速度(たとえば、1回転/秒)で回転するような照明パターンを用いる[Hafi 2014]。蛍光色素の励起光の吸収には指向性があり、色素の吸収遷移双極子モーメントと励起光の偏光面とのなす角  $\theta$  とすると、励起効率は  $\cos^2 \theta$  に比例する。したがって、励起光の偏光面の回転により蛍光物体からの蛍光は変調する。少しずつずれた位置に配向角の異なる蛍光色素が複数存在するとき、撮影した顕微鏡像ではボケによりかなり重なっていても、このような蛍光変調情報を含む画像データに対して位相検波検出を伴う最適化計算に掛けることにより、近接した色素同士を分解した超解像画像を再構成できる。

連絡先: 永井健治, 大阪大学産業科学研究所, 大阪府茨木市  
美穂ヶ丘8-1, 06-6879-8481, ng1@sanken.osaka-u.ac.jp

## (2) SPoD-ExPAN 法の原理

SPoD-ExPAN 法では、蛍光発光可能な ON 状態と蛍光発光しない OFF 状態との間を光照射で遷移させることが可能な、光スイッチング蛍光色素を使う[Hafi 2014]. 蛍光色素を ON 状態へ遷移させる光 (ON 光) と励起光は偏光面を同じとし、その一方で蛍光色素を OFF 状態へ遷移させる OFF 光を ON 光に直交させた偏光面で同時使用することで、蛍光色素の ON/OFF 遷移を強制的に行いながら蛍光観察する。これにより、蛍光変調の変調振幅を SPoD に比べて増強させることができる。したがって、SPoD-ExPAN の方が SPoD に比べて近接した蛍光色素同士をより良好に分解できる。

## (3) Kohinoor 観察のための SPoD-ExPAN 超解像顕微鏡の実装

Kohinoor 観察の SPoD-ExPAN 超解像顕微鏡は、基本的には、通常の蛍光顕微鏡 (落射蛍光顕微鏡) の光学系構成を利用したものであり、従来の SPoD-ExPAN 顕微鏡の光学系構成 [Hafi 2014] を改変することで製作した (図 A)。光スイッチング蛍光タンパク質の Kohinoor は、励起光と ON 光は同じ波長 470–488 nm, OFF 光は 405 nm を使うことができる。我々の SPoD-ExPAN 顕微鏡では、470 nm および 405 nm の 2 台の LED 光源を用い、それらのビームを一つの光路に合流させ、モーターで回転させた波長板を通して偏光面を回転させた。モーター内蔵のロータリーエンコーダーの出力信号を適宜変換した信号でカメラの撮影開始を制御することで、照明光の偏光面の回転と同期して撮影を行った。

## (4) SPoD, SPoD-ExPAN における再構成計算

SPoD 法および SPoD-ExPAN 法では、画像生データを再構成計算に掛けることで超解像画像を得る。求めたい超解像画像は試料面上における蛍光色素の空間分布である。しかし、試料面から発生する蛍光を顕微鏡で撮影すると、光の性質により像にボケが発生する。そこで、SPoD 法または SPoD-ExPAN 法の超解像画像再構成では、「蛍光色素の予想空間分布から逆算した生画像データのエミュレーションと、実際の撮影画像データとの相違ができるだけ少なくなるような、蛍光色素の空間分布を予想する」という逆問題の計算を行っている。

SPoD 法, SPoD-ExPAN 法では、超解像画像再構成に正則化最尤推定を用いている。従来法[Hafi 2014]では、蛍光色素の空間分布の L1 ノルムを正則化項として最尤関数に加えることでスパースな蛍光色素分布の解を得る傾向のアルゴリズムによって、画像高解像度化を図っている。ところが、我々が様々な細胞試料を SPoD-ExPAN 法で計測し、L1 正則化最尤推定による画像再構成を試みたところ、L1 正則化では超解像画像への補正が過剰になり、病的な解を算出する事例がしばしば起こった。

このため、我々は、このような L1 正則化最尤推定によるアーテファクトの問題を解決するために、超解像画像再構成計算の改良を図った。試行錯誤の結果、L1 正則化項を Lp 正則化項に入れ替え、p 値を  $1 < p < 2$  の範囲でスパースな解を求める傾向を調整することで、そのアーテファクトをかなり解消することができた。また、計算時間も従来法と比べてせいぜい数倍~10 倍くらいの増加であり、現実的な時間内での計算を実現した。

## 2.2 生細胞の SPoD-ExPAN 超解像イメージング

本研究で開発した SPoD-ExPAN 顕微鏡と超解像画像再構成計算法を用いて、生細胞の超解像イメージングを試みた。細胞内タンパク質と Kohinoor との融合タンパク質をコードしたプラスミド DNA をヒト由来の HeLa 細胞内に導入し、その融合タンパク質を発現させた。これまでに、細胞骨格、細胞膜、核、あるい

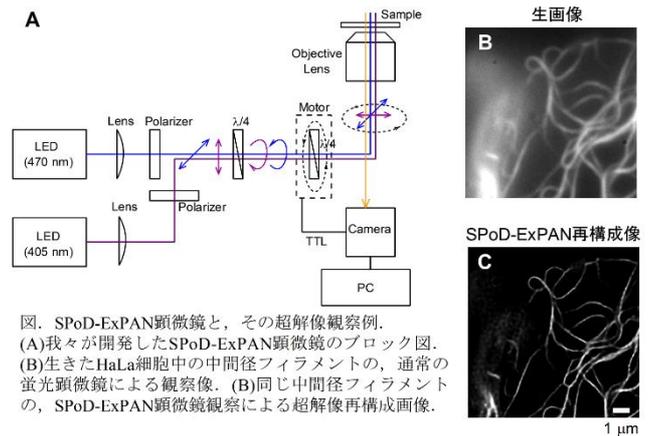


図. SPoD-ExPAN顕微鏡と、その超解像観察例。  
(A)我々が開発したSPoD-ExPAN顕微鏡のブロック図。  
(B)生きたHeLa細胞中の中間径フィラメントの、通常の蛍光顕微鏡による観察像。(B)同じ中間径フィラメントの、SPoD-ExPAN顕微鏡観察による超解像再構成画像。

はミトコンドリア等に局在するタンパク質と Kohinoor との融合タンパク質の HeLa 細胞中での SPoD-ExPAN 観察を行っている。図に示したのは、中間径フィラメントの観察例である。生画像に映っているフィラメントは、光学顕微鏡の分解能ゆえ、250 nm 以上の太さで映っている (図 B)。ところが、SPoD-ExPAN 観察し、超解像画像の再構成をおこなったところ、光の回折限界を超えた高分解能を達成した (図 C)。

## 3. バイオイメージングにおける、超解像顕微鏡技術の今後の展望

これまでの超解像顕微鏡技術の開発によって、細胞内の精細な構造を可視化できるようになったが、従来の超解像顕微鏡での観察からは、電子顕微鏡で観察可能な情報以上のものは得られていない。今後、超解像顕微鏡技術が生物学上の諸問題を解明するためのツールとして活躍していくには、生体試料に対するダメージが少ない観察 (生体適合性超解像イメージング) が最低限必要である。さらに、細胞内の構造の可視化のみならず、細胞内の酵素反応や情報伝達といった細胞生理機能の高分解能での可視化が望まれる。また、観察の範囲は平面にとどまらず、3 次元の超解像観察を経時的に行う、タイムラプス 3 次元超解像観察がライフサイエンスの日常の研究ツールとして使われる時代もいずれ到来するであろう。そのときには、単一の観察実験の出力ですらビッグデータになるので、データ解析にはコンピュータサイエンスとのより一層の連携が必要になるであろうと思われる。

## 参考文献

- [Egging 2015] Egging, C., Willig, K.I., Sahl, S.J., Hell, S.W. Lens-based fluorescence nanoscopy, *Q. Rev. Biophys.*, 2015.
- [Uno 2015] Uno, S., Tiwari, D.K., Kamiya, M., Arai, Y., Nagai, T., Urano, Y. A guide to use photocontrollable fluorescent proteins and synthetic smart fluorophores for nanoscopy. *Microscopy*, 2015.
- [Hafi 2014] Hafi, N., Grunwald, M., van den Heuvel, L.S., Aspelmeier, T., Chen, J.-H., Zagrebelsky, M., Schütte, O.M., Steinem, C., Korte, M., Munk, A., Walla, P.J. Fluorescence nanoscopy by polarization modulation and polarization angle narrowing. *Nat. Methods*, 2014.
- [Tiwari 2015] Tiwari, D.K., Arai, Y., Yamanaka, M., Matsuda, T., Agetsuma, M., Nakano, M., Fujita, K., Nagai, T. A fast and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laser-power RESOLFT nanoscopy. *Nat. Methods*, 2015.