

課題番号	LR024
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	生体機能可視化のための超解像分子イメージング技術の開発
研究機関・ 部局・職名	大阪大学・大学院工学研究科・准教授
氏名	藤田 克昌

1. 当該年度の研究目的

<p>1) 多光子飽和励起による3次元組織の超解像観察</p> <p>蛍光プローブの多光子励起の飽和を用いて、それを細胞内部の超解像イメージングを行う。3次元培養による細胞組織を試料とし、細胞内分子の超解像観察を試みる。</p> <p>2) 非線形応答分子の開発</p> <p>前年度までに試作した分子を高速分光計測することにより、発光、電荷移動、各励起状態からの緩和の効率を求め、そこから求められる理論的な非線形応答と実際の測定結果とが一致するか確認する。また、生体試料染色用プローブとして利用するために、水溶性の向上も目的とする。</p> <p>3) 蛍光タンパク質の可視光多光子励起と3次元超解像イメージング</p> <p>複数種の蛍光タンパク質を同時に発現する生体試料の作製と、その高解像度3次元イメージングを目的とする。</p> <p>4) コヒーレントラマン散乱の飽和分光測定と顕微鏡システムの試作</p> <p>ラマン散乱の飽和効果の超解像観察への利用を検討する。試料への照明光の強度とラマン散乱の強度との関係を測定し、それによる空間分解能および波数分解能の向上を見積り、超解像ラマン顕微鏡の試作を行う。</p>

2. 研究の実施状況

<p>1) 多光子飽和励起による3次元組織の超解像観察</p> <p>試料内深部の超解像イメージングの可能性を確認するため、3次元培養によるヒトガン細胞の細胞組織試料を作製し、前年度までに試作した顕微鏡システムを用いて観察した。深さ 65μm の試料深部においても2光子励起の飽和が誘起されることが確認でき、従来の2光子励起顕微鏡に比べて空間分解能が向上していることが確認された。</p> <p>2) 非線形応答分子の開発</p> <p>光励起前および直後からの光吸収スペクトルの変化を時間的に分離して計測することにより、蛍光分子の状態がどのような速度で変化するか計測した。その結果、光励起後の電荷分離状態への移動速度、またその後の蛍光発光までの速度を見積もることに成功した。その結果を想定される分子発光メカニズムに</p>

代入して得られた分子応答と、実際の測定結果がほぼ一致したため、作製した蛍光が当初の想定どおり非線形な発光を生み出していると結論付けた。また、作製した分子へのカルボキシル基の付加により、その水溶性を向上することにも成功した。

3) 蛍光タンパク質の可視光多光子励起と3次元超解像イメージング

群青、シアン、ティール、緑の光を発する4種の異なる蛍光タンパク質を発現する細胞を作製し、その超解像観察に成功した。可視光による多光子励起を行うことで、それらを同時に観察できることを確認した。従来技術に比べ約2倍の空間分解能が達成できること、また特に細胞内部の観察に有効であることを実験的に確認した。また、蛍光検出感度を向上させた高速イメージングシステムの試作も行った。

4) コヒーレントラマン散乱の飽和分光測定と顕微鏡システムの試作

コヒーレントラマン散乱の飽和現象をダイヤモンド粒子を試料として確認し、それにより高次の非線形な応答を誘起できることを実験的に見出した。この非線形な応答は、光により分子振動が励起された際に顕著に表れることを確認し、これを利用して分光測定の超解像化を行えることを実証した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計6件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計3件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. T. Shimozawa, K. Yamagata, T. Kondo, S. Hayashi, A. Shitamukai, D. Konno, F. Matsuzaki, J. Takayama, S. Onami, H. Nakayama, Y. Kosugi, T. M. Watanabe, <u>K. Fujita</u>, Y. Mimori-Kiyosue, "Improving spinning disc confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging," Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 110(9), pp. 3399-404 (2013); doi: 10.1073/pnas.1216696110 2. H. Lee, T.-Y. Su, Y. Yonemaru, Ming-Ying Lee, M. Yamanaka, K.-F. Huang, S. Kawata, <u>K. Fujita</u>, S.-W. Chu, "Plasmon saturation induced super-resolution imaging," Proc. SPIE Vol.8597, Plasmonics in Biology and Medicine X, 85970P (2013); doi:10.1117/12.2003815 3. T.-Y. Su, Y. Yonemaru, M. Yamanaka, M.-Y. Lee, H. Lee, S. Kawata, <u>K. Fujita</u>, S.-W. Chu, "Saturable scattering of localized surface plasmon resonance in a single gold nanoparticle," Proc. SPIE 8457, Plasmonics: Metallic Nanostructures and Their Optical Properties X, 845713 (2012); doi:10.1117/12.929120 <p>(掲載済み一査読無し) 計2件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 山中真仁, <u>藤田克昌</u>, "飽和励起を用いた高空間分解蛍光イメージング," レーザー研究, Vol.41, No.2, pp.113-118 (2013). 2. <u>藤田克昌</u>, "光学顕微鏡の限界を超えた超解像イメージング," 実験医学, Vol. 31, No.3, pp.451-457 (2013). <p>(未掲載) 計1件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. M. Yamanaka, K. Saito, N. I. Smith, S. Kawata, T. Nagai, <u>K. Fujita</u>, "Saturated excitation (SAX) of fluorescent proteins for sub-diffraction-limited imaging of living cells in three dimensions" Interface FOCUS (accepted).
<p>会議発表 計13件</p>	<p>専門家向け 計12件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 山中真仁, 上垣久美子, SMITH Nicholas, 河田聡, <u>藤田克昌</u>, "飽和励起(SAX)顕微鏡を用いた多層化細胞群の高解像蛍光イメージング," 応用物理学会春季学術講演会(厚木, 2013年, 3月27日~30日). 2. 桶谷亮介, SU Tung-Yu, 米丸泰央, LEE Hsuan, 山中真仁, LEE Ming-Yin, 河田 聡, CHU Shi-Wei, <u>藤田克昌</u>, "超解像イメージング:飽和したプラズモン光散乱の利用," 応用物理学会春季学術講演会(厚木, 2013年, 3月27日~30日). 3. H.-Y. Wu, Y. Yonemaru, Y.-Yu Su, M. Yamanaka, Y.-T Huang, S. Kawata, <u>K. Fujita</u>, and S.-W. Chu, "Saturable and reverse saturable scattering of a single gold nanoparticle," Focus on Microscopy 2013 (Maastricht, 2013年, 3月24日~27日). 4. M. Yamanaka, K. Uegaki, N. I. Smith, S. Kawata, <u>K. Fujita</u>, "High-resolution fluorescence imaging of cells in 3D culture by saturated excitation (SAX) microscopy," Focus on Microscopy 2013 (Maastricht, 2013年, 3月24日~27日).

様式19 別紙1

	<p>5. 藤田克昌, “光を用いた細胞内部の超解像イメージング,” 応用物理学会東海支部 第20回基礎セミナー「バイオメディカルフォトニクス」(名古屋、2013年1月18日).</p> <p>6. 藤田克昌, “光学技術の限界を超える超解像分子イメージング,” 日本学術振興会 光エレクトロニクス第130委員会 第284回研究会 (東京、2012年10月3日).</p> <p>7. M. Yamanaka, N. I. Smith, S. Kawata, K. Fujita, “Saturated excitation (SAX) microscopy; high depth-resolution fluorescence imaging,” 2012年秋季第73回応用物理学会学術講演会, (愛媛, 2012年, 9月11~17日)</p> <p>8. 藤田克昌, “超解像イメージング:伝播光を使ったユニークな手法,” 日本分光学会第48回夏期セミナー (幕張, 2012年9月7日).</p> <p>9. 藤田克昌, “光学顕微鏡の解像力の限界を超える” 第48回日本小児循環器学会総会・学術集会 (国立京都国際会館, 2012年7月5日).</p> <p>10. K. Fujita, “High-resolution confocal microscopy using saturated and nonlinear excitation,” Joint meeting of the 45th annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the 64th annual meeting of the Japan Society of Cell Biology (神戸国際会議場, 2012年5月31日).</p> <p>11. K. Fujita, “Super resolution microscopy using optical saturation,” 日本顕微鏡学会 学術講演会 (つくば, 2012年5月15日).(企画も担当)</p> <p>12. T.-Y. Su, Y. Yonemaru, M.-Y. Lee, M. Yamanaka, H. Lee, S. Kawata, K. Fujita, S.-W. Chu, “Study of saturable scattering of single gold nanoparticle for super-resolution imaging,” Focus on Microscopy 2012 (Singapore, 2012年, 4月2日~5日).</p> <p>一般向け 計1件</p> <p>1. 藤田克昌, “顕微光学,” 大阪大学ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究推進機構 社会人再教育プログラム(2012年6月20日, 阪大中之島センター)</p>
<p>図書</p> <p>計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況</p> <p>計1件</p>	<p>(取得済み) 計1件</p> <p>1. 名称: Fluorescence microscopy and fluorescence microscopy method(欧州) 発明者: 藤田克昌、小林実、河田聡、中村直子、出願人: 国立大学法人 大阪大学 登録番号: EP1835323、登録日: 2012年8月1日</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>大阪大 大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 藤田克昌 http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/ap1g1kat/index_j.html</p> <p>大阪大学・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next</p> <p>大阪大学大型教育研究プロジェクト支援室・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>2012年10月23日に大阪大学フォトニクスセンターと共同で、地域の小学生を対象とした光科学体験セミナー「スーパー光塾」を開催した。ペットボトルとガラス玉を用いた簡単な顕微鏡と植物試料の作製および観察、また、作製した顕微鏡による身近な微小物体の観察を体験していただいた。 (参加者数 小学生50名、保護者50名)</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

様式19 別紙1

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	123,000,000	46,591,000	47,234,000	29,175,000	0
間接経費	36,900,000	13,977,300	14,170,200	8,752,500	0
合計	159,900,000	60,568,300	61,404,200	37,927,500	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	33,757	47,234,000	0	47,267,757	47,247,965	19,792	0
間接経費	6,472,562	14,170,200	0	20,642,762	10,235,629	10,407,133	0
合計	6,506,319	61,404,200	0	67,910,519	57,483,594	10,426,925	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	23,654,431	半導体レーザー他消耗品など
旅費	2,059,736	学会やシンポジウムへの参加など
謝金・人件費等	20,255,444	特任研究員、特任事務職員の雇用
その他	1,278,354	実験具の修理や学会参加費など
直接経費計	47,247,965	
間接経費計	10,235,629	
合計	57,483,594	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
z軸ピエゾステージ /コントローラー	P-611.ZS型 Z軸 ピエゾステージ 100μm SGS/E- 625.S0型 PIFOC ピエゾアンプ/ サーボコントロー ラー	1	514,500	514,500	2012/6/28	大阪大学
恒温低湿空気発生 器	PAP03B-SPR	1	1,459,500	1,459,500	2012/7/10	大阪大学
LD励起コンパクト CWレーザー	LD励起532nmCW	1	1,981,140	1,981,140	2012/8/21	大阪大学
デジタルガルバノミ ラー	GM-1010	1	770,385	770,385	2012/9/28	大阪大学
顕微鏡デジタルカメ ラ	オリンパス製 DP73	1	1,039,500	1,039,500	2012/10/29	大阪大学

対物レンズ	ニコン製 CFI Plan Apo IR 60XWI	1	1,086,750	1,086,750	2012/11/21	大阪大学
AOM用2CHドライ バー	IntraAction社製 DFE-402B3J CH1 40MHz 2W CH2 30to50MHz 2W	1	593,512	593,512	2012/11/28	大阪大学
ラジアル偏光コン バーターおよびLC ドライバー	RADPOL4/USB LC driver	1	784,350	784,350	2012/12/3	大阪大学
ファインポリクロ メータ	MK-300TD	1	2,766,750	2,766,750	2012/12/19	大阪大学
CSU用特注ダイク ロイックミラー	DM-IV-125	1	790,965	790,965	2013/3/5	大阪大学
光励起半導体レー ザー(λ:488nm)	コヒレント社製 GenesisMX488- 1000-SLM-S	1	3,045,000	3,045,000	2013/3/8	大阪大学
小型個体レーザー Samba	コボルト社 Samba 532 nm(300mW)	1	1,470,000	1,470,000	2013/3/29	大阪大学