

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 25 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>a) 非線形応答分子を用いた高速超解像観察</p> <p>前年度までに開発した非線形応答分子を細胞内に導入し、細胞内部構造の超解像高速観察を行う。多焦点励起光学系を用いることで、撮像速度の向上を図る。</p> <p>b) 蛍光タンパク質の可視光多光子励起観察</p> <p>蛍光タンパク質を導入した生細胞の超解像ライブイメージングを目的とする。多焦点による可視光による多光子励起により、生細胞内の微細構造のビデオレートイメージングを試みる。また、生細胞観察時の光ダメージについて検討する。</p> <p>c) 無標識超解像観察技術の開発</p> <p>照明光学系を工夫することにより、空間分解能、および空間的なラマンスペクトルの分離能の向上させたラマン散乱顕微鏡を開発する。細胞の無標識イメージングに必要となるスペクトル情報の取得も行う。</p>
--

2. 研究の実施状況

<p>a) 非線形応答分子を用いた高速超解像観察</p> <p>前年度までに開発した非線形応答分子を細胞内に導入し、細胞内部構造の超解像高速観察を試みた。撮像の高速化のために、多数のレーザー焦点により細胞内の複数の部位で非線形蛍光励起を行う光学系を構築し、撮像速度の高速化に成功した。</p> <p>また、非線形応答分子の発光特性に関する理解も進め、撮像速度をより高速化するための蛍光分子特性について考察を行った。これまでに開発した蛍光分子では、非線形応答の発生に重要な電荷分離状態の寿命が10ピコ秒程度であり、この寿命を1~2桁大きくすることで、より低光強度の照射で非線形蛍光応答を誘起できることがわかった。さらに、励起光にパルスレーザーを用いた場合に、より高次の非線形応答を誘起できることを新たに発見した。この発光のメカニズムは現時点では明らかでは無いが、この発見により、提案する手法の空間分解能をさらに向上させる可能性が見いだされた。</p> <p>b) 蛍光タンパク質の可視光多光子励起観察</p> <p>mTFP1, EGFP を導入した細胞を試料とし、可視光多光子励起による超解像ライブイメージングを試みた。上述の多焦点励起光学系に波長 525nm のパルスレーザー光を導入し、細胞内の蛍光タンパク質の2</p>
--

様式19 別紙1

光子励起を行った結果、生細胞の超解像画像を得ることに成功した。観察時間分解能の評価を EGFP を発現したゴルジ体の動態の観察により行い、約 33 ミリ秒の時間分解能を達成した。

可視光多光子励起の細胞損傷に関する検討も行った。PI を用いた細胞損傷の評価においては、細胞損傷は総露光量に大きく依存するという結果が得られ、多焦点励起条件下で総露光量が約 50 秒を超えると細胞損傷が顕著に表れた。この結果より観察目的に合わせて露光量を調整すれば、生理活性を維持したまま可視光多光子励起観察が可能であるという結論を得た。

c) 無標識超解像観察技術の開発

従来から開発してきたラマン散乱顕微鏡の照明光学系に改良を加えることで、空間分解能を向上させることを試みた。試料の照明に周期的なパターンを持つレーザー光を利用し、その周期的なパターンによるモアレ効果により微細構造の情報を効率的に結像する手法を利用した。その結果、従来の手法に比べ約 2 倍の空間分解能の向上を確認した。

また、細胞観察のためのスペクトル情報を、マウス脳組織細胞、マウス幹細胞、マウス筋肉細胞のラマン観察を通して得た。特にマウス幹細胞においては細胞の分化が進むにつれスペクトル特性が変化しており、細胞状態の無標識検出という、ラマン分光イメージングの新しい応用展開を示唆する結果が得られた。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 9 件
計 13 件	<ol style="list-style-type: none"> 1. M. Yamanaka, N. I. Smith, K. Fujita, "Introduction to super resolution microscopy," Microscopy (online). 2. L.-d. Chiu, A. F. Palonpon, N. I. Smith, S. Kawata, M. Sodeoka, and K. Fujita, "Dual-polarization Raman spectral imaging to extract overlapping molecular fingerprints of living cells," J. Biophotonics (online). 3. Y. Yonemaru, M. Yamanaka, N. I. Smith, S. Kawata, K. Fujita, "Saturated excitation microscopy with optimized excitation modulation," ChemPhysChem, Vol.15, No.4, pp.743-749(2014). 4. S.-W. Chu, H.-Y. Wu, Y.-T. Huang, T.-Y. Su, H. Lee, Y. Yonemaru, M. Yamanaka, R. Oketani, S. Kawata, S. Shoji, and K. Fujita, "Saturation and reverse saturation of scattering in a single plasmonic nanoparticle," ACS Photonics, Vol.1, No.1, 32-37 (2014). 5. S.-W. Chu, T.-Y. Su, R. Oketani, Y. Yonemaru, M. Yamanaka, Y.-T. Huang, H.-Y. Wu, H. Lee, G.-Y. Zhuo, M.-Y. Lee, S. Kawata, and K. Fujita, "Measurement of a saturated emission of optical radiation from gold nanoparticles: Application to an ultrahigh resolution microscope," Phys. Rev. Lett., Vol.112, No.1, p.017402 (2014). 6. T. Ichimura, L.-d. Chiu, K. Fujita, S. Kawata, T. M. Watanabe, T. Yanagida, H. Fujita, "Visualizing cell state transition using Raman spectroscopy," PLOS ONE, Vol.9, No.1, e84478 (2014). 7. N. Pavillon, K. Fujita, N. I. Smith, "Multimodal label-free microscopy," J. Innov. Opt. Health. Sci. 7(5), 1330009-1~22 (2014). 8. 藤田克昌, "ミクロな世界を立体的に映し出す - レーザー走査型顕微鏡 -," 応用物理, 83 (1) 63-67 (2014). 9. M. Yamanaka, Y. Yonemaru, S. Kawano, K. Uegaki, N. I. Smith, S. Kawata, K. Fujita, "Saturated excitation microscopy for sub-diffraction-limited imaging of cell clusters," J. Biomed. Opt., Vol.18, No.12, p.126002 (2013). <p>(掲載済み一査読無し) 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 藤田克昌, "超解像蛍光イメージング," OplusE, 36 (2) 141-146 (2014). 2. 藤田克昌, "超解像顕微鏡," 生体の科学, 64 (6) 526-532 (2013). 3. 藤田克昌, "飽和励起顕微鏡," 光技術コンタクト, Vol.51, No.4, pp.13-19 (2013).

様式19 別紙1

	<p>4. 藤田克昌, “飽和励起顕微鏡 - シンプルな超解像技術 -,” 現代化学, Vol.505, No.4, pp.54-56 (2013).</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計12件</p>	<p>専門家向け 計11件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. K. Fujita, “Saturated excitation microscopy for super-resolution imaging in 3D,” Japan Taiwan Bilateral Conference on Biomedical and Plasmonic Imaging (Taipei, 26 Feb 2014). 2. 藤田克昌, “非線形蛍光応答の誘起と超解像イメージングへの利用,” 応用物理学会 量子エレクトロニクス研究会「バイオ・メディカルフォトンクス:基礎と応用の最前線」(長野 2013年12月21日). 3. K. Fujita and S. Kawata, “Super-resolution confocal microscopy using saturated excitation (SAX microscopy),” International Symposium on Super-Resolution Imaging 2013 (Super Imaging 2013) (Hamamatsu, 2 Dec 2013). 4. 藤田克昌, “超解像顕微鏡の進展,” バイオ単分子研究会 (盛岡, 2013年11月10日). 5. 藤田克昌, “光学顕微鏡の最前線と関連技法の現状,” 日本顕微鏡学会 様々な極微イメージング技術研究部会 第1回研究会 (福岡, 2013年10月19日). 6. 藤田克昌, “光学応答の飽和を利用した超解像顕微鏡,” 日本顕微鏡学会 第69回学術講演会 (ホテル阪急エキスポパーク, 2013年5月20日). 7. 上垣 久美子, 米丸 泰央, 山中 真仁, N. I. Smith, 河田 聡, 藤田 克昌, “SAX 顕微鏡を用いた三次元培養細胞の超解像イメージング,” 第61回応用物理学会春期学術講演会 (神奈川, 2014年3月17日). 8. K. Fujita, M. Yamanaka, K. Saito, N.I. Smith, S. Kawata, T. Nagai, “Nonlinear deep-UV excitation microscopy for multicolor fluorescent protein imaging with high spatial resolution,” SPIE Photonics West (San Francisco, 4 Feb 2014). 9. M. Yamanaka, K. Saito, N. I. Smith, S. Kawata, T. Nagai, K. Fujita, “Sub-diffraction-limited imaging of fluorescent protein expressed in living cells by saturated excitation (SAX) microscopy,” SPIE Photonics West (San Francisco, 2 Feb 2014). 10. 米丸 泰央, 山中 真仁, スミス ニコラス, 下村 竜司, 河田 聡, 藤田 克昌, “蛍光の飽和応答の変調光周波数依存と飽和励起 (SAX)顕微鏡への応用,” Optics and Photonics Japan (奈良, 2013年11月14日). 11. M. Yamanaka, K. Uegaki, N. I. Smith, S. Kawata, K. Fujita, “High-resolution fluorescence imaging of a multi-layer cell cluster by saturated excitation (SAX) microscopy,” SPIE Optics and Photonics (San Diego 27 August 2013). <p>一般向け 計1件</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 (2013年6月19日, 阪大中之島センター)
<p>図書 計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況 計2件</p>	<p>(取得済み) 計1件 国内 名称: 撮像装置 発明者: 藤田克昌、出願人: 藤田克昌 出願番号: 特願 2013-161165、出願日: 平成 25 年 8 月 2 日</p> <p>(出願中) 計1件 国内 名称: 顕微鏡及び観察方法 発明者: 藤田克昌, 河野省吾, 山中真仁, 河田聡、出願人: 国立大学法人 大阪大学 登録番号: 特許 5311595、登録日: 平成 25 年 7 月 12 日</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 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 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>

様式19 別紙1

<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>2013年12月8日に大阪大学フotonics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1件</p>	<p>“金ナノ粒子に強い光 光散乱効果の飽和を発見” 日刊工業新聞 2014年1月14日(火) 朝刊11面</p>
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

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	93,825,000	29,175,000	0	
間接経費	36,900,000	28,147,500	8,752,500	0	
合計	159,900,000	121,972,500	37,927,500	0	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	19,792	29,175,000		29,194,792	29,194,792	0	
間接経費	10,407,133	8,752,500		19,159,633	19,159,633	0	
合計	10,426,925	37,927,500	0	48,354,425	48,354,425	0	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	7,537,180	
旅費	1,670,376	
謝金・人件費等	18,653,632	
その他	1,333,604	
直接経費計	29,194,792	
間接経費計	19,159,633	
合計	48,354,425	

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
コンパクトCWレー ザー	AN-719-750-325-G2-8L4791 数量:ALSR-522-10000A-W	1	1,121,400	1,121,400	2014/1/23	大阪大学
				0		
				0		