



Title	Modulated excitation microscopy for three-dimensional bio-imaging
Author(s)	山中, 真仁
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58498
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	やま なか まさ ひと 山 中 真 仁
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 6 9 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学 位 論 文 名	Modulated excitation microscopy for three-dimensional bio-imaging (変調励起顕微鏡による3次元バイオイメーjing)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 河 田 聡 (副査) 教 授 木 下 修 一 教 授 近 藤 寿 人 教 授 柳 田 敏 雄

論 文 内 容 の 要 旨

The spatial resolution in optical microscopy is subject to the diffraction limit of light. This classical limitation is overcome in fluorescence microscopy by using saturation or photoswitching effects in optical transitions of fluorescent molecules. Although these techniques offer significant improvement of the spatial resolution in biological imaging, these methods can only be applied to limited samples such as a thin sample or a surface. The development of a technique that can be utilized to observe a wide range of diverse biological samples still remains a challenge.

In this dissertation, I discuss a technique to improve the spatial resolution of fluorescence microscopy by using saturation phenomena in the fluorescence emission of probe molecules. The nonlinear fluorescence response is induced by saturating the molecular population at the excitation state. The molecules are excited by modulated laser light to extract the nonlinear fluorescence signal that contributes to construction of a high-resolution image. For this purpose, I built a laser scanning confocal microscope combined with the saturated excitation (SAX) and observed biological samples. The observation results confirmed the improvement of the spatial resolution in three dimensions beyond the diffraction limit.

Next, I discuss the use of fluorescence nanodiamonds for a photostable fluorescent probe. Biological samples with nanodiamonds did not show any photobleaching effect in repetitive observations by SAX microscopy. The high photostability of the nanodiamonds allows us to introduce a highly intense excitation light to induce a high nonlinear fluorescence response by saturated excitation and exhibit the 4th-order nonlinear response in fluorescence emission.

The saturation effect is also observed in two-photon excitation and applied to the improvement of spatial resolution in two-photon fluorescence microscopy. Fluorescence beads were excited by modulated laser light to induce and extract high-order nonlinear fluorescence response, and the improvement of the spatial resolution in three-dimensions was confirmed. This result indicates that SAX microscopy can be applied for high resolution imaging of deep tissues.

The development of a fluorescence molecule for improving the spatial resolution is also

discussed. I developed a molecule consisting of two fluorophores and a linker, which shows nonlinear fluorescence response under multiple single-photon excitation. I confirmed that the molecule shows 2nd order nonlinear fluorescence response by measuring the fluorescence intensity with various excitation intensity. The result indicates that this molecule has the potential to push the spatial resolution beyond the diffraction limit in conventional confocal fluorescence microscopy.

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本学位申請論文は、細胞の3次元超解像観察を目的とし、励起光強度の変調を用いて超解像蛍光顕微鏡を開発し、細胞観察を行った研究をまとめたものである。その成果は以下に集約できる。

- ・超解像蛍光顕微鏡を、励起光強度の変調用の音響光学素子および蛍光信号中の高調波信号を検出用のロックインアンプを共焦点蛍光顕微鏡の光学系に組み込み、試作した。
- ・HeLa細胞のチトクロムC、アクチンなどの細胞内小器官を観察した結果、高調波周波数を持つ蛍光信号が3次元空間分解能の向上に寄与することを示した。
- ・褪色しないことで知られる蛍光ダイヤモンドを観察し、開発した超解像蛍光顕微鏡では、より高次の高調波周波数を持つ信号を検出するほど高い空間分解能が得られることを示した。
- ・2光子励起蛍光においても蛍光強度の飽和が生じること、およびその飽和現象が空間分解能の向上に利用出来ることを示した。

以上のように、本学位審査論文では、蛍光顕微鏡において光の回折限界を超えた空間分解能を実現する手法を提案している。これらの結果は、生命科学に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値有るものと認める。