



Title	High-resolution fluorescence microscopy using nonlinear modulation of fluorescence emission
Author(s)	久保, 俊貴
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82262
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

氏 名 (久保 俊貴)	
論文題名	High-resolution fluorescence microscopy using nonlinear modulation of fluorescence emission (非線形蛍光変調による高解像蛍光顕微鏡)
論文内容の要旨 In this dissertation, I summarized the development of optical microscopy techniques that provide high spatial resolution and image contrast in the observation of thick specimens especially using nonlinear excitation by visible light and adaptive optics in confocal microscopy. I developed a slit-scanning confocal microscope using visible-wavelength two-photon excitation (v2PE) to realize high speed and high spatial resolution in hyperspectral fluorescence imaging. The use of v2PE provided high spatial resolution owing to the 2nd order nonlinearity of the fluorescence emission. In addition, simultaneous excitation of multiple fluorescent proteins using a single excitation wavelength was realized in the slit-scanning confocal microscopy with detecting spectral information which helps to distinguish the species of fluorescent proteins. The exposure time was up to 1 ms per line which corresponds to about 2 μs per pixel in a point scanning system. I succeeded in simultaneous multi-color fluorescence imaging of living HeLa cells expressing multiple fluorescent proteins in their intracellular structures. I also investigated light-material interactions that induce higher-order nonlinearity through v2PE to improve spatial resolution. Using saturated two-photon excitation, 4th order nonlinearity was induced in the excitation-emission relation of fluorescent dyes. The resolution improvement by the nonlinear response was confirmed in imaging of HeLa cells with expressing ATTO Rho6G on actin filaments. The use of reversibly photo-switchable fluorescent protein (RSFP) with v2PE was also examined. I used v2PE to activate RSFPs and one-photon excitation to detect the fluorescence signal, where absorption three photons to generate a signal photon, resulting in granting 3rd order nonlinearity in the excitation and emission relation. I confirmed that several species of RSFPs can be activated by v2PE in the wavelength range of 530-560 nm. I applied the nonlinear activation technique in confocal imaging of living HeLa cells and confirmed the improvement of the spatial resolution in three dimensions that corresponds to the theoretical estimation. Aperture correlation microscopy using sensor-less adaptive optics was developed to simultaneously realize high speed and 3D spatial resolution in confocal microscopy to observe thick specimens. The observations of neuromuscular junctions and egg chambers of drosophila were performed with and without aberration correction. The comparison of the images clearly showed the improvement of the signal amount and the spatial resolution in observation of the thick samples. I also developed a system to evaluate the characteristics of RSFPs, such as the nonlinearity in fluorescence emission, the switching speed, and the emission spectra. An optical system equipped with CW lasers with several wavelengths and a femtosecond pulsed laser with a wavelength-tunable within the range of 350-2500 nm were developed to measure the activation and emission properties of fluorescence proteins. Time-resolved measurement of fluorescence responses at a frequency of 1MHz at each pixel was achieved by modulating the laser intensities and programmable gating of fluorescence spectrum detection. Thousands of species of RSFPs were measured by the system and found RSFPs showing the 4th order nonlinearity under the excitation of 560 nm pulsed laser.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (久保 俊 貴)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤田 克昌
	副 査	教授	菅原 康弘
	副 査	教授	高原 淳一
	副 査	教授	根本 知己 (自然科学研究機構)

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、蛍光顕微鏡において、蛍光プローブの高次の非線形蛍光応答の誘起や補償光学を利用し、生体試料の内部観察における空間分解能の向上、像コントラストの向上、および多重分光観察の実現に関する研究についてまとめたものである。その成果は以下の通りである。

- ・可視光による 2 光子励起を用いたスリット走査型共焦点顕微鏡を開発し、多色染色した生体細胞のハイパースペクトルイメージングに成功している。開発した顕微鏡の光学伝達関数を理論計算により求め、従来の 1 光子励起共焦点顕微鏡の光学伝達関数との比較を行い、非線形な蛍光応答を利用が高い 3 次元空間分解能をもたらすことを確認している。
- ・可視光 2 光子励起の飽和を利用した高次非線形応答の誘起および、共焦点顕微鏡における超解像イメージングの実現に成功している。緑色蛍光蛋白質の励起-発光特性をシミュレートし、4 次非線形応答が誘起されることを理論的に導いている。可視光 2 光子励起の飽和が点像分布関数に与える影響を理論的に求め、従来技術と比べて、空間分解能が約 1.3 倍向上することを確認している。実験的にも、直径 100 nm 蛍光ビーズおよび生体細胞のアクチンフィラメントの観察より、空間分解能の向上を確認している。
- ・可視光 2 光子励起を光スイッチング蛍光タンパク質の活性化に用いることで、励起光強度に対して 3 次の非線形性を有する蛍光発光を誘起する手法を提案し、実験的にそれが可能であることを示している。3 次の非線形蛍光による点像分布関数を理論的に求め、3 次非線形応答の誘起法を共焦点顕微鏡に活用することによる空間分解能の向上を確認している。また、生細胞のアクチンフィラメントの観察により、実験的に得られる空間分解能を求め、それが理論分解能と一致することを確認している。
- ・回転ディスク型の構造化照明顕微鏡に補償光学を導入するため、デフォーマブルミラーを波面補正装置に用いた顕微光学系を開発している。ショウジョウバエの神経筋接合部や卵巣などの生体試料の内部の観察において、補償光学による収差補正を用いることで、像コントラストおよび実効的な空間分解能の向上を達成している。
- ・可視光パルス励起における蛍光発光特性を計測する装置を開発し、4 次以上の高次な非線形応答を示す蛍光タンパク質の発見に成功している。

以上のように、本学位論文は、高次の非線形な蛍光応答を誘起する方法を開発し、光学顕微鏡結像特性を制御することで、高空間分解能かつ高コントラストに生体試料の内部を観察することに成功している。これらの成果は応用物理学、特にナノフォトニクスにおいて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あるものと認める。