

【目的】 近年、神経回路の網羅的解析（コネクトーム解析）のプロジェクトが全世界的に展開されている。特に FIB-SEM や SBF-SEM、ATUM などの走査型電子顕微鏡を用いた諸技術の急速な進歩に伴い、脳組織の三次元再構築に対する障壁が低減しつつあり、コネクトーム研究の加速化に貢献している。一方、三次元再構築された脳の電子顕微鏡像から特定の神経細胞を抽出する、いわゆるセグメンテーションの自動化については、機械学習的アプローチをはじめとする様々なアルゴリズムが開発されているものの、現時点で決定的な手法は確立されていない。また、蛍光タンパク質等で神経細胞を標識することで得られる特定の神経細胞の脳内における分布や投射先などの広域情報をシナプスレベルでの超微細形態情報と対応づけることはセグメンテーションをはじめとするコネクトーム解析において有用であるが、光学顕微鏡像と電子顕微鏡像とを対応付けるための光・電子相関顕微鏡法（CLEM）について決定的な手法が確立されていない。その理由の一つとして電子顕微鏡用試料作製過程におけるオスミウム酸固定や脱水過程により、大半の蛍光タンパク質が消光することが挙げられる。そこで本研究では機械学習的手法を用いて CLEM に利用可能な蛍光プローブの開発を目指した。

【方法】 電子顕微鏡用試料作製過程におけるオスミウム酸固定と脱水過程に耐えうる蛍光標識法として、低分子蛍光化合物に着目し、とくに電子顕微鏡用樹脂の有する自家蛍光を回避するため、アップコンバージョンナノパーティクル（UCNP）に着目した。また、蛍光タンパク質の中では植物における光屈性を誘導する光受容タンパク質フォトトロピンに着目した。フォトトロピンの LOV2 ドメイン（photLOV2）にはフラビンモノヌクレオチド（FMN）が結合し、蛍光を発する。FMN の蛍光がオスミウム酸固定や脱水処理に影響されないことに着目し、photLOV2 に結合しうる低分子化合物を機械学習的アプローチにより探索した。また、photLOV2 の FMN との結合に関わるアミノ酸に突然変異を導入し、安定な蛍光を発する分子の探索を試みた。

【結果】 電子顕微鏡用試料作製処理におけるオスミウム酸固定や脱水処理を行っても蛍光が消光しない photLOV2 変異体を作製することに成功した。また、機械学習によるドッキング解析から、photLOV2 と結合することが予想される低分子性化合物の候補分子を複数見出すことができた。

機械学習的アプローチによる CLEM プローブ開発

