

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-505979

(P2015-505979A)

(43) 公表日 平成27年2月26日 (2015. 2. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G02B 21/36 (2006.01)	G02B 21/36 ZNA	2G043
G01N 21/66 (2006.01)	G01N 21/66	2G045
G01N 21/64 (2006.01)	G01N 21/64 E	2H052
G02B 21/06 (2006.01)	G02B 21/06	4B024
G01N 33/68 (2006.01)	G01N 33/68	4B029
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 91 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-543566 (P2014-543566)
 (86) (22) 出願日 平成24年11月21日 (2012. 11. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年7月23日 (2014. 7. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/066303
 (87) 国際公開番号 W02013/078347
 (87) 国際公開日 平成25年5月30日 (2013. 5. 30)
 (31) 優先権主張番号 61/563, 537
 (32) 優先日 平成23年11月23日 (2011. 11. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507044516
 プレジデント アンド フェローズ オブ
 ハーバード カレッジ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 138, ケンブリッジ, クインシー
 ストリート 17
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 コーエン, アダム, イー.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2138, ケンブリッジ, リナイアン ス
 トリート 43, #45

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高い空間的および／または時間的精度での撮像のためのシステムおよび方法

(57) 【要約】

本発明の様々な側面は、高い空間的および／または時間的な分解能で撮像するためのシステムおよび方法に一般に向けられる。一側面において、本発明は、動的プロセスの高い空間的および時間的な分解能に適した光学顕微鏡システムおよび関連する方法に一般に向けられる。前記システムは蛍光撮像と併せて使用することができ、ここで蛍光は電圧指示タンパク質によって仲介することができる。いくつかの場合において時間的な分解能は、画像から受信したシグナル値に対して、既定義の時間波形をフィッティングすることによって増強できる。前記システムはまた、高開口数の対物レンズおよび対象領域への撮像光路に位置するズームレンズを含めてもよい。本発明の他の側面は、かかるシステム、かかるシステムまたは方法を実施可能な製造された記憶装置などに関するかかるシステム、キットを作製または使用する技術に一般に向けられる。

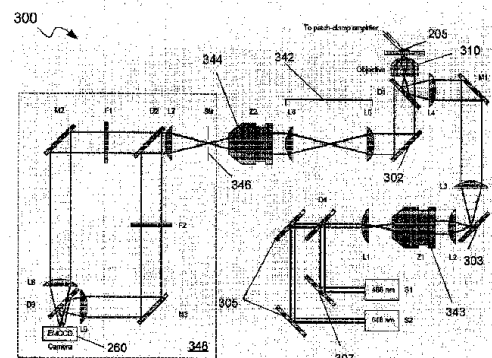


FIG. 3A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

動画像を時間分解するための方法であって、該方法は、以下：

複数の撮像素子から、前記動画像が得られる間の複数の測定時間域に関連する複数のシグナル値を受信すること；および、

少なくともいくつかの前記画素において、既定義の時間波形を、各画素につき受信された前記シグナル値の夫々に対してフィッティングすることを含む、前記方法。

【請求項 2】

フィッティングすることが、測定時間域のいずれか最小の持続時間よりも細かい時間分解能を提供する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

動画像が、顕微鏡により得られる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

動画像が、蛍光顕微鏡により得られる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

動画像が、X 線撮像システムにより得られる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

動画像が、磁気共鳴撮像システムにより得られる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 7】

動画像が、ビデオ記録システムにより得られる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 8】

複数のシグナル値が、CCD 撮像装置により得られる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

複数のシグナル値が、MOSFET 撮像アレイにより得られる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

複数のシグナル値が、光電子増倍管のアレイにより得られる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 11】

複数のシグナル値が、アバランシェフォトダイオードのアレイにより得られる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

測定時間域が、各撮像素子の夫々につき、シグナル積分時間に対応する、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

複数のシグナル値が、一連のフレームとして受信され、各フレームが、1 つの測定時間間隔につき、試料の画像を形成する複数のシグナル値を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 14】

既定義の時間波形が、測定時間域の平均値よりも細かい時間分解能を有する、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

既定義の時間波形が、細胞の活動電位を表す波形である、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

既定義の時間波形が、ガウス波形である、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

。

50

【請求項 17】

既定義の時間波形が、指数部分を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

既定義の時間波形が、対数正規波形である、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

各画素につき、波形によって特徴付けられる事象のときの発生率を決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

事象が、波形における特定の特徴に対応する、請求項 19 に記載の方法。

10

【請求項 21】

事象が、ピーク値に対応する、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

事象が、最小値に対応する、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 23】

事象が、前選択された閾値に対応する、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 24】

各画素につき、動画像を表示する場合に、事象が発生しなかった時間域で受信したシグナル値を抑制することをさらに含む、請求項 19 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

抑制することが、事象が発生しなかった時間域でのシグナル値を、ゼロ値またはバックグラウンドシグナルレベル値まで低減することを含む、請求項 24 に記載の方法。

20

【請求項 26】

各画素につき、動画像の時間発展を表す複数の追加シグナル値を生成することであって、前記追加シグナル値が、各画素につき、シグナル積分時間未満の測定間隔に対応する；および、

前記動画像の時間分解された動画像を表示する場合に、時系列的に、少なくとも 1 つの前記追加シグナル値を表示すること

を含む、請求項 19 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

追加シグナル値の各値が、既定義の時間波形を表す、請求項 26 に記載の方法。

30

【請求項 28】

事象の発生を除く時間に発生する追加シグナル値の値が、既定義の時間波形を表す値未満の値まで抑制される、請求項 26 または 27 に記載の方法。

【請求項 29】

複数の撮像素子を有する撮像アレイ；および

前記撮像アレイと連通するプロセッサ

を含む撮像システムであって、前記プロセッサが、

複数の前記撮像素子から、動画像が得られる間の複数の測定時間域と関連する複数のシグナル値を受信する；および、

40

前記の各画素において、既定義の時間波形を、各画素につき受信された前記シグナル値の夫々に対してフィッティングする

ために構成される、前記撮像システム。

【請求項 30】

プロセッサによって実行された場合に、

複数の撮像素子から、動画像が得られる間の複数の測定時間域と関連する複数のシグナル値を受信する；および、

前記の各画素において、既定義の時間波形を、各画素につき受信された前記シグナル値の夫々に対してフィッティングする

ようにプロセッサを適合させる使用説明書を含む、製造された記憶装置。

50

【請求項 3 1】

対象領域；

約 0.9 より大きな開口数を有し、かつ前記対象領域からの撮像光路中に位置する対物レンズ；および

前記撮像光路中に位置する第 1 ズームレンズを含む、光学システム。

【請求項 3 2】

光学システムが、蛍光顕微鏡用に構成される、請求項 3 1 に記載の光学システム。

【請求項 3 3】

対象領域が、生体試料を支持する、請求項 3 1 または 3 2 に記載の光学システム。

10

【請求項 3 4】

対象領域が、生きている生体試料を支持する、請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 3 5】

対象領域が、細胞を支持する、請求項 3 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 3 6】

対象領域が、パッチクランプを支持するために構成される、請求項 3 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 3 7】

対象領域が、少なくとも 1 つのマイクロ流体チャンネルを含む、請求項 3 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の光学システム。

20

【請求項 3 8】

対物レンズが、照明光路においても存在する、請求項 3 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 3 9】

対物レンズが、約 20 倍超の倍率を提供する、請求項 3 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 4 0】

対物レンズが、約 60 倍超の倍率を提供する、請求項 3 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の光学システム。

30

【請求項 4 1】

第 1 ズームレンズが、約 18 mm と約 200 mm との間で変化する焦点距離を提供する、請求項 3 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 4 2】

第 1 ズームレンズが、約 3 と約 7 との間で F 値を提供する、請求項 3 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 4 3】

対物レンズが、液浸対物レンズである、請求項 3 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の光学システム。

40

【請求項 4 4】

対物レンズが、対象領域において試料の全反射照明を提供するために構成される、請求項 3 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 4 5】

対物レンズが、対象領域において試料の薄層近傍入射照明を提供するために構成される、請求項 3 1 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 4 6】

第 1 ズームレンズが、対物レンズに対していずれか調節もせずに、対象領域における試料の光学システムの撮像平面で、画像倍率を変えるために構成される、請求項 3 1 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の光学システム。

50

【請求項 47】

対物レンズと第1ズームレンズとの間に配置されたリレー光学系をさらに含む、請求項31～46のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 48】

リレー光学系が、第1ズームレンズの入射瞳付近の対物レンズで画像を中継する、請求項47に記載の光学システム。

【請求項 49】

リレー光学系が、第1無色二重レンズと、相隔てられた第2無色二重レンズとを含む、請求項47または48に記載の光学システム。

【請求項 50】

リレー光学系が、見失っていたであろう対物からの発散放射を、第1ズームレンズへと向ける、請求項47～49のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 51】

第1ズームレンズの後ろの撮像光路中に配置される、分割の、ダイクロイック画像捕捉機器をさらに含む、請求項31～50のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 52】

画像捕捉機器が、電子増倍CCDカメラを具備する、請求項51に記載の光学システム

。

【請求項 53】

光学システムの照明路中に位置する第2ズームレンズをさらに含む、請求項31～52のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 54】

第2ズームレンズが、対象領域内で照明範囲を変化させるために構成される、請求項53に記載の光学システム。

【請求項 55】

第1波長について第1放射を提供する第1放射源；および、

第2波長について第2放射を提供する第2放射源

をさらに含む、ここで前記の第1放射および第2放射が、対象領域を照明するように第2ズームレンズへと向けられる、請求項53または54に記載の光学システム。

【請求項 56】

第1放射源が、広帯域放射源および音響光学チューナブルフィルターを含む、請求項55に記載の光学システム。

【請求項 57】

通常照明と、薄層照明と、全反射照明との間の対象領域における照明を変えるために構成される照明光路中に配置された調節可能なミラーをさらに含む、請求項55または56に記載の光学システム。

【請求項 58】

照明光路中に配置され、かつ選択された空間的パターンを第1放射に付与するために構成されるデジタル光ミラーレイをさらに含む、請求項55～57のいずれか一項に記載の光学システム。

【請求項 59】

電圧指示タンパク質を含む試料および感光部分を提供すること；

前記感光部分に対し、それを通じてイオン輸送の増大を引き起こさせる強度で、少なくとも第1波長を有する第1光で、前記試料の少なくとも一部を照明すること；および

前記電圧指示タンパク質に対し、電圧依存的な様式で蛍光発光を引き起こさせる強度で、少なくとも第2波長を有する第2光で、前記試料の少なくとも一部を照明することを含む、方法。

【請求項 60】

感光部分が、光ゲートイオンチャンネルである、請求項59に記載の方法。

【請求項 61】

10

20

30

40

50

光ゲートイオンチャンネルが、チャンネルロドプシンである、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 2】

試料が、さらに細胞を含む、請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 3】

細胞が、神経細胞である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

第 1 波長で神経細胞の軸索のみを照明することをさらに含む、請求項 6 3 の方法。

【請求項 6 5】

第 1 波長で神経細胞の樹状突起のみを照明することをさらに含む、請求項 6 3 の方法。

10

【請求項 6 6】

第 1 波長で神経細胞の細胞体のみを照明することをさらに含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 7】

細胞が、心臓細胞である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 8】

電圧指示タンパク質および感光部分が、各々細胞内に含まれる、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 9】

電圧指示タンパク質および感光部分が、各々細胞の細胞膜に存在する、請求項 6 2 に記載の方法。

20

【請求項 7 0】

試料からの少なくとも 1 つの発光波長を決定することをさらに含む、請求 5 9 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 1】

発光波長が、膜電位を示す参照と比較される、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

少なくとも 1 つの発光波長を使用して試料の少なくとも 1 つの画像を取得することをさらに含む、請求項 7 0 または 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

少なくとも 1 つの画像が、約 0 . 9 より大きい開口数を有する対物を使用して取得される、請求項 7 2 に記載の方法。

30

【請求項 7 4】

少なくとも 1 つの発光波長を使用して試料から複数の画像を取得することを含む、請求項 7 2 または 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

複数の画像が、少なくとも 1 フレーム / 1 m s の速度で取得される、請求項 7 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、本明細書中に参照により組み込まれる 2 0 1 1 年 1 1 月 2 3 日に出願された米国特許仮出願番号 61/563,537 題名「SYSTEMS AND METHODS FOR IMAGING AT HIGH SPATIAL AND/OR TEMPORAL PRECISION」の優先権を主張する。

【0 0 0 2】

政府の資金援助

本発明の様々な側面につながる研究は、N I H 助成金番号第 1-R01-EB012498-01 および 1-DP2-OD007428、ならびに O N R 助成金番号 N000141110-549 によって少なくとも部分的に援助された。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

50

【 0 0 0 3 】

背景

蛍光顕微鏡は生物学的プロセスを研究するために研究および開発応用において通常使用される。関心の種、例えば細胞、タンパク質、遺伝子、抗体、抗原などは、1つまたは2つ以上の蛍光物質を標識し、次に試料を顕微鏡で観察する間に蛍光物質を励起する放射で照明してもよい。いくつかの場合において、標識された種は、顕微鏡で観察される、より大きな試料の一成分であってもよい。試料の高分解能の画像は1つまたは2つ以上標識された種からの蛍光と合わせて得ることができ、観察された蛍光は、例えば遺伝子の発現、抗体の存在、細胞内の特定のタンパク質の位置などの基礎となる化学的または生化学的プロセスの診断測定を提供できる。

10

【 0 0 0 4 】

現在、特別仕様の顕微鏡を蛍光顕微鏡の用途のために購入することができる。かかる顕微鏡は、周囲の放射および/または励起放射を遮断するための特殊なフィルターを具備することができる。それらはまた、バックグラウンド蛍光を低減させるために低蛍光光学系を、および撮像対象の近傍で焦点外の方法から画像に対する不要な寄与を低減させる特殊な照明方式（例えば薄層照明(slim-field illumination)、または全反射照明(TIRF)など)を備えてもよい。さらに、容易に検出可能な蛍光を提供するために、高い量子効率を示す緑色蛍光タンパク質(GFP)などの蛍光標識を操作した。

【 0 0 0 5 】

概要

本発明は、ある態様において、動的な低光レベル蛍光顕微鏡に関する。本発明のある態様は、電圧感受性蛍光タンパク質を利用する生物学的プロセスを研究するためのシステムおよび方法に一般向けられる。これらのタンパク質は本明細書において電圧指示タンパク質(voltage-indicating protein)（「VIP」）とも呼ばれ、VIPの存在下で静電位に（いくつかの場合では、直線的に）依存し得る蛍光シグナルを提供することができる。したがって、VIPを使用することによって、時間変化する電位の空間的および時間的なダイナミクスを、例えば生きている生物学的試料など、細胞または他の試料などの様々なシステムにおいてリアルタイムおよび/または顕微鏡レベルで観察または測定することができる。

20

【 0 0 0 6 】

ある態様において、本発明は高い空間的分解能および時間的分解能の両方で低光レベルの蛍光を検出するように適合された蛍光顕微鏡光学システムに向けられる。一態様により、低光レベルの蛍光を観察するための光学システムは対象領域および約0.9より大きい開口数（「NA」）を有する対物レンズを備え、対象領域からの撮像光路中に位置する。前記光学システムは、撮像光路中にまた位置するズームレンズをさらに備えてもよい。対物レンズは、液浸対物であってもよい。いくつかの態様により、リレー光学系は対物レンズとズームレンズ間の撮像光路中に配置され、対物レンズ位置からズームレンズへの入射瞳のおよその位置に対して画像を中継するように構成される。

30

【 0 0 0 7 】

光学システムは、光学システムの撮像位置で検出された撮像シグナルを受信し処理するように構成されたプロセッサをさらに備えてもよい。撮像シグナルの処理は、前記顕微鏡によって得られた動画像を、時間分解するために使用できる。撮像シグナルは、画素化検出器（例えば、CCDまたはMOSFET検出器アレイ）から受信することができる。前記プロセッサは、複数の時間域(time bins)につき複数の撮像画素から記録された複数の放射シグナル値を受信するように構成することができる。各画素につき時間域化された複数のシグナルが存在してもよい。プロセッサはさらに、各画素につき受信された夫々のシグナル値に対して既定義の時間波形を各画素につきフィッティングするように構成することができる。いくつかの態様により、プロセッサは各画素につき前記フィッティングに基づいて事象のときの発生率を決定し、動画像を表示する場合に事象が発生しなかった時間域で、各画素につき記録されたシグナル値を抑制するようにさらに構成される

40

50

。

【0008】

また意図されるものは、プロセッサによって実行された場合に、複数の時間域につき複数の撮像画素から記録された複数の放射シグナル値を受信するように適合させ、上記の顕微鏡の動画像を時間分解するための受信シグナルを処理する機械可読命令(machine-readable instruction)を含む、1つまたは2つ以上の製造された記憶装置である。

【0009】

別の側面において、本発明は動画像を時間分解するための方法に一般に向けられる。一組の態様において、前記方法は、動画像が得られる間の複数の測定時間域と関連する複数のシグナル値を複数の撮像画素から受信し、各画素につき受信された夫々のシグナル値に対して既定義の時間波形を少なくともいくつかの画素につきフィッティングすることを含む。

10

【0010】

本発明の別の態様は、光学システムに一般に向けられる。一組の態様において、光学システムは対象領域、対象領域からの撮像光路中に位置する約0.9より大きい開口数を有する対物レンズ、および撮像光路中に位置する第1ズームレンズを含む。対物レンズおよび関連する撮像光学系は、例えば生物学的標本などの試料の高い空間分解能の画像を取得するために使用することができる。光学システムは、試料を照明するための機器をさらに具備してもよい。例えば、照明機器は、蛍光を励起または試料を刺激するために使用される励起放射源を具備してもよい。前記照明機器は、少なくとも一部の撮像光路中に1つまたは2つ以上の励起ビームをカップリングさせることができる。いくつかの態様において、前記照明機器は、空間的にパターン化された照明を提供するように構成されたデジタルマイクロミラー装置を具備してもよい。照明機器は、試料上にデジタルマイクロミラーから空間的にパターン化された照明を投影することができる。

20

【0011】

なお別の側面において、本発明は撮像システムに一般に向けられる。ある態様において、撮像システムは、複数の撮像画素を有する撮像アレイおよび撮像アレイと連通するプロセッサを備え、ここで前記プロセッサは、複数の撮像画素から、動画像を得る間の複数の測定時間域に関連する複数のシグナル値を受信し、各画素につき、既定義の時間波形を、各画素につき受信した夫々のシグナル値に対してフィッティングするように構成される。

30

【0012】

本発明は、さらに別の側面において、複数の撮像画素から、動画像を得る間の複数の測定時間域に関連する複数のシグナル値を受信し、各画素につき、既定義の時間波形を、各画素につき受信した夫々のシグナル値に対してフィッティングするように適合させる命令を含む、製造された記憶装置に一般に向けられる。

【0013】

さらに別の側面より、本発明は、電圧指示タンパク質を含む試料および感光部分を提供する行為、前記感光部分に対し、それを通じてイオン輸送の増大を引き起こさせる強度で、少なくとも第1波長を有する第1光で、前記試料の少なくとも一部を照明する行為、前記電圧指示タンパク質に対し、電圧依存的な様式で蛍光発光を引き起こさせる強度で、少なくとも第2波長を有する第2光で、前記試料の少なくとも一部を照明する行為を含む方法に一般に向けられる。

40

【0014】

上記および他の側面、態様、ならびに本教示の特色は、添付の図面と併せて以下の説明からより完全に理解することができる。本発明の主題事項は、いくつかの場合において、相互に関連する製品、特定の問題に対する代替解決策、および/または1つまたは2つ以上のシステムおよび/または物品の種々の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

50

当業者は、本明細書に記載の図が図示の目的に過ぎないことを理解するだろう。いくつかの例において、本発明の理解を容易にするために、本発明の様々な側面が誇張または拡大されて示され得ると理解されるべきである。図面において、同様の参照文字は、様々な図全体にわたって機能的に類似および/または構造的に類似な要素である同様の特色を一般に参照する。図面は、教示の原理を図示する際に、必ずしも記載される代わりにスクーリングされ強調されることはない。図面は、決して本教示の範囲を限定するものではない。

【 0 0 1 6 】

【図 1 A】図 1 A は、脂質二重膜中の微生物ロドプシン（グリーンプロテオロドプシンの D 9 7 N 変異体）を図示する。

10

【 0 0 1 7 】

【図 1 B】図 1 B は、本発明のある態様に従った図 1 A の微生物ロドプシンの電圧感受性蛍光のメカニズムを描写する。

【 0 0 1 8 】

【図 1 C】図 1 C は、別のある態様における微生物ロドプシンの印加電圧への蛍光依存性を図示するグラフである。

【 0 0 1 9 】

【図 2】図 2 は、一態様より、動的な低光レベル顕微鏡システムのブロック図である。

【 0 0 2 0 】

【図 3 A】図 3 A は、本発明の一態様に係る顕微鏡システムを描写する。

20

【 0 0 2 1 】

【図 3 B】図 3 B は、図 3 A のシステムで実施することができる対象領域の照明の様々な種類を図示する。

【 0 0 2 2 】

【図 4 A - 4 D】図 4 A ~ 4 D は、ある態様にしたがって、神経細胞に沿った活動電位の伝播によって、急速に時間変化する蛍光を神経細胞に沿って生じさせることができる、電圧感受性蛍光タンパク質でトランスフェクトされた神経細胞の描写である。

【 0 0 2 3 】

【図 5 A】図 5 A は、ある態様において活動電位および最小測定間隔 T_m を描写する。

【 0 0 2 4 】

【図 5 B】図 5 B は、ある態様に従って、連続する測定間隔 T_m にわたって画素につき記録された測定試料に対する波形（本例においては活動電位）のフィッティングを図示する。

30

【 0 0 2 5 】

【図 5 C】図 5 C は、一態様により、1つの画素につき顕微鏡動画像の時間超分解能を図示する。

【 0 0 2 6 】

【図 5 D】図 5 D は、他の態様により、1つの画素につき、検出シグナルが1つのサブ測定間隔で表示される顕微鏡動画像の時間超分解能を図示する。

【 0 0 2 7 】

【図 5 E - 5 F】図 5 E ~ 5 F は、本発明の追加の態様により、顕微鏡動画像の1つの画素につき時間超分解能を図示する。

40

【 0 0 2 8 】

【図 6】図 6 は、顕微鏡動画像を時間分解するための行為を表すフローチャートである。

【 0 0 2 9 】

【図 7 A】図 7 A は、電圧センサーとしての A r c h のモデルを描写する。pH および膜電位の両方がシッフ塩基のプロトン化を変えることができる。キューベットの A r c h を発現する無処置の大腸菌を含む。示された結晶構造はバクテリオロドプシンであり；A r c h の構造は解明されていない。

【 0 0 3 0 】

50

【図 7 B】図 7 B は、中性および高 pH で精製された A r c h の吸光度（実線）および蛍光発光（破線）スペクトルを示す。

【 0 0 3 1 】

【図 7 C】図 7 C は、膜電位の関数としての A r c h の蛍光を示す。蛍光は - 1 5 0 m V でのその値で除した。

【 0 0 3 2 】

【図 7 D】図 7 D は、- 7 0 m V と + 3 0 m V の間の膜電位におけるステップに対する A r c h の動的応答を図示する。立ち上がりおよび立ち下りの端での行き過ぎ量(overshoot)は電子補償回路の人為産物であった。図 7 C と比較して振幅がより小さいのは、図 7 D においてバックグラウンド減算が行われなかったためである。データは 2 0 サイクルにわたって平均した。挿入図：ステップ応答は撮像システムの 5 0 0 μ s 未満の分解能において発生した。

10

【 0 0 3 3 】

【図 7 E】図 7 E、上図：A r c h の蛍光によって可視化された A r c h を発現する H E K 細胞。図 7 E、下図：電圧依存性蛍光の画素重み行列(pixel-weight matrix)領域。スケールバーは 1 0 ミクロン。

【 0 0 3 4 】

【図 8 A】図 8 A は、中性（青）および高 pH（緑）での A r c h の W T の吸光度を示す。中性 pH で A r c h は 5 5 8 n m で最大限に吸収した。蛍光発光（赤色の破線）を 1 % D M 中に可溶化した 2 μ タンパク質について約 5 3 2 n m の ϵ_{exc} で記録した。

20

【 0 0 3 5 】

【図 8 B】図 8 B は、図 8 A と同じ条件下での A r c h ^{D 9 5 N} のスペクトルを示す。吸収極大は約 5 8 5 n m であった。

【 0 0 3 6 】

【図 8 C】図 8 C は、p H 約 6 と p H 約 1 1 の間に精製タンパク質について記録された吸収スペクトルを図示する。プロトン化状態における S B の割合を p H の関数として算出するために、4 0 0 ~ 7 5 0 n m の間の吸収スペクトルの特異値分解(Singular Value Decomposition)を使用した。結果は S B の p K_a を決定するためにヒル関数にフィッティングした。

【 0 0 3 7 】

【図 9】図 9 は、本発明のいくつかの態様において、A r c h の W T の周波数応答を示す。

30

【 0 0 3 8 】

【図 1 0】図 1 0 は、本発明のさらに他の態様における電圧に対する A r c h の W T の感度を示す。電圧ステップは約 1 0 m V であった。全細胞膜電位は、直流電圧の記録 V（青色）および重み付けされた A r c h 蛍光

【数 1】

$$\hat{V}_{FL}$$

（赤）によって測定した。

40

【 0 0 3 9 】

【図 1 1 A】図 1 1 A は、A r c h の蛍光によって画像化された培養ラット海馬神経細胞を示す。タンパク質は膜に局在した。スケールバーは 1 0 μ m。図 1 1 A ~ 1 1 G の群は、一態様により、A r c h を有する A P の光学的記録を描写する。

【 0 0 4 0 】

【図 1 1 B】図 1 1 B、左図：図 1 1 A における神経細胞の低倍率画像。図 1 1 B、右図：5 0 0 フレーム / s で単一試行記録の間の全視野(whole-field)蛍光トレース（赤）。蛍光は 7 . 3 m V の r m s 偏差で電気生理学的データ（青）に重ねるようにスケールした。

【 0 0 4 1 】

50

【図 1 1 C】図 1 1 C、左図：平均蛍光（シアン）の上に重ねた全視野と単一画素の強度（赤色）の間の相互相関の画素毎のマップ。細胞体の左上に伸びるプロセスが電氣的に細胞から切り離され消えていることに注意。図 1 1 C、右図：全視野強度との相関によって決定された重み係数(weighting coefficient)を有する画素重み付け(Pixel-weighted)蛍光トレース（赤）。重み付け蛍光は、4.2 mV での r m s 偏差で電気生理学的データ（青）に重ねるようにスケールした。

【0 0 4 2】

【図 1 1 D】図 1 1 D、左図：平均蛍光（シアン）の上に重ねた電気生理学データと単一画素強度（赤色）の間の相互相関の画素毎のマップ。図 1 1 D、右図：電気生理学データに相関により決定された重み係数を有する画素重み付け蛍光トレース（赤）。蛍光と電圧の間の r m s 偏差は 4.0 mV である。図 1 1 B ~ 図 1 1 D 中のスケールバーは 50 μ m。

10

【0 0 4 3】

【図 1 1 E】図 1 1 E は、A P の細胞内局在を図示する。左図：色付けされた多角形で指示された関心領域。右図：対応する色で指示された領域中の 98 の事象にわたって平均した A P の時間経過。一番上の黒のトレースは電氣的記録である。光学的記録は、カメラの有限な露光時間（2 m s）のため広がったように見える。白い矢印で指示された小さな突出部は細胞の残りの部分に対して相対的に大幅に遅れた A P を有する。蛍光トレースの縦のスケールは任意である。スケールバーは 10 μ m。

20

【0 0 4 4】

【図 1 1 F】図 1 1 F は、500 μ s / フレームで記録された A P の単一試行の記録のギャラリーを表す。画素重み行列は、添付の電気生理学的記録から決定し、蛍光は電圧に重なるように自動的にスケールした。図 1 1 F、右上：電圧（青）および蛍光（赤）を示す、単一細胞中の 269 の事象につき平均化されたスパイク応答。

【0 0 4 5】

【図 1 1 G】図 1 1 G は、高密度な培養において単一の標的神経細胞に関連するプロセスの識別を描写する。左図：トランスフェクトされた複数の神経細胞の時間平均した A r c h 蛍光。右図：膜電位は、全細胞電圧クランプ(whole-cell voltage clamp)によって調整した。応答画素は画素強度および印加電圧の相互相関によって識別され、標的細胞の神経突起（赤）を強調する。スケールバーは 10 μ m。

30

【0 0 4 6】

【図 1 2】図 1 2 は、本発明のある態様に従った細胞の活動電位を図示する。蛍光トレースの縦のスケールは任意である。細胞の下領域は、単一試行毎に A P を指示するために十分な S N R を有していなかった。

【0 0 4 7】

【図 1 3 A - 1 3 B】図 1 3 A ~ 1 3 B は、本発明のさらに他の態様において細胞の様々な活動電位を図示する。

【0 0 4 8】

【図 1 4 A】V = 0 でクランプされた H E K 細胞において発現された A r c h の W T および D 9 5 N における光電流。細胞は $= 640 \text{ nm}$ 、 $1800 \text{ W} / \text{cm}^2$ で光のパルスで照明した。図 1 4 A ~ 1 4 D の群は、一態様により、電圧依存性蛍光を示すが光電流を示さない A r c h D 9 5 N を描写する。

40

【0 0 4 9】

【図 1 4 B】図 1 4 B は、- 120 ~ + 120 mV のほぼ線形な感受性で - 150 mV と + 150 mV の間で約 3 倍増加した A r c h D 9 5 N の蛍光を示す。挿入図：電圧感受性のマップ。スケールバーは 5 μ m。

【0 0 5 0】

【図 1 4 C】図 1 4 C は、- 70 mV と 30 mV の間の膜電位におけるステップに対する A r c h D 9 5 N の動的応答を描写する。データは 20 サイクルにわたって平均した。挿入図：500 μ s（応答の 20%）よりも速い構成成分および 41 m s の時定数を有する

50

構成成分を含んだステップ応答。

【0051】

【図14D】図14Dは、電圧ランプでの校正後、ArchD95Nが膜電位の高度に正確な推定値を提供し、12s未満の時間スケールにかけて $260\mu V / (z)^{1/2}$ の蛍光から推定された電圧におけるノイズで、約10mVの電圧ステップを明確に分解することを図示する。

【0052】

【図15】図15は、ArchWTと同じ様式で測定されたArchD95Nの周波数応答を描写する(図9)。

【0053】

【図16A】図16Aは、電流注入のパルスおよびレーザー照明($I = 1800 W / cm^2$ 、 $\lambda = 640 nm$)を施し、ArchWTを発現する神経細胞の電的に記録された膜電位。照明は、細胞が閾値に近い場合に、APを抑制するために十分な光電流を産生した。赤いバーは、レーザー照明を指示する。図16A~16Dの群は、一態様より、ArchD95Nを有するAPの光学的記録を表描写する。

【0054】

【図16B】図16Bは、ArchD95Nを発現する神経細胞において図16Aと同じ注射および照明条件の下で記録されたデータを示し、スパイクまたは静止電位に対する照明の効果を示さない。

【0055】

【図16C】図16Cは、ArchD95Nを発現する神経細胞を示し、ArchD95Nの蛍光(シアン)、および電圧依存性蛍光の領域(赤)を示す。スケールバーは10 μm 。

【0056】

【図16D】図16Dは、一連のAPの間、全細胞膜電位(青)および重み付けされたArchD95N蛍光(赤色)の単一試行の記録を表す。

【0057】

【図17】図17は、速度および感受性によって分類される膜電位の光学的指標の描写である。緑の四角は、GFPのホモログの膜タンパク質への融合に基づく指標を表す。ピンクの四角は、微生物ロドプシンに基づく指標を表す。青いダイヤモンドは、有機色素および色素-タンパク質のハイブリッドの指標を表す。伸ばしたバーは、2つの時定数が報告されている指標を意味する。プロテオロドプシン光学プロトンセンサー(PROPS)はArchD95Nのホモログである。大半の有機色素の速度は精密に知られてないが、500 μs 未満で応答する。ここでプロットしたデータは表4から取り出される。

【0058】

【図18A】図18Aは、いくつかの態様により、Optopatchコンストラクトのデザインを描写する。

【0059】

【図18B】図18Bは、細胞の原形質膜におけるOptopatchコンストラクトの図示である。青色光(488nm)はChR64を刺激し、イオンチャンネルを開けさせ、細胞を発火させる。赤色光(640nm)はArchからの蛍光を膜電圧に依存する程度まで励起する。

【0060】

【図18C】図18Cは、図18BのようにOptopatchコンストラクトを発現する神経細胞からの蛍光および電圧を示す。光刺激は、従来のパッチクランプ電気生理学(一番下の行)およびArchの蛍光(一番上の行)の両方によって検出された活動電位を産生した。

【0061】

【図19A】図19Aは、一態様より、Optopatch実験と併せて、空間的にパターン化され局所化された活動電位の開始に使用される照明機器を描写する。

10

20

30

40

50

【0062】

【図19B】19Bは、Optopatch実験において青色光の励起に応答する単一活動電位の発生を示す赤色蛍光の過渡バースト(transient burst)を示す。

【0063】

【図20A】図20Aは、細胞体が青色光で励起された神経細胞の時間分解顕微鏡像を示す。伝播する活動電位の時間ダイナミクスは本生データにおいて分解されなかった。

【0064】

【図20B】図20Bは、時間的な神経細胞内の活動電位ダイナミクスの時間超分解能を図示する。達成した時間分解能は約100マイクロ秒であった。

【0065】

本発明の特色および利点は、図面と併せて以下の詳細な説明からより明白になるだろう。

【0066】

詳細な説明

I. 緒言

本発明の様々な側面は、高い空間的および/または時間的な分解能で撮像するためのシステムおよび方法に一般に向けられる。一態様において、本発明は、動的プロセスの高い空間的および時間的な分解能に適合した、光学または顕微鏡システムおよび関連した方法に一般に向けられる。前記システムは、蛍光撮像と併せて使用してもよく、ここで蛍光は電圧指示タンパク質によって仲介されてもよい。いくつかの場合において、時間分解能は、既定義された時間波形を、画像から受信したシグナル値に対してフィッティングすることによって増強することができる。前記システムはまた、高開口数の対物レンズおよび対象領域への撮像光路中に位置するズームレンズを具備してもよい。本発明の他の側面は、かかるシステム、かかるシステムに関するキット、かかるシステムまたは方法を実施することができる製造された記憶装置などの製造または使用の技術に一般に向けられる。

【0067】

したがって、ある態様において、本発明は、例えば時間的に変化するプロセスおよび/または低光レベルのプロセスを観察および/または定量できるものなど、光学または顕微鏡システムに一般に向けられる。かかるプロセスは、例えば電圧指示タンパク質(VIP)に関連した顕微鏡試料の急速および/または空間的に変化する蛍光を含むことができる。いくつかの場合において、VIPは蛍光である。本明細書で議論されるような顕微鏡システムはかかるタンパク質との使用に限定されることを意図しないが、顕微鏡システムの開発はVIP(例えば細菌ロドプシン)に関係する研究と併せて進行した。代わりに、前記顕微鏡システムは、例えば時間的に変化するプロセスおよび/または低光レベルのプロセスなどを有する様々な用途で 사용할ことができる。例えば、いくつかの態様において、細胞や生体などの試料においてミクロンレベルの分解能以下でサブミリ秒のダイナミクスを、本明細書で議論されるような一定の顕微鏡システムで分解できる。いくつかの態様において、300nmもの小さい空間分解能を20マイクロ秒もの短い時間分解能で得ることができる。

【0068】

II. 顕微鏡システム

様々な側面において、本発明は、電圧指示タンパク質を使用して細胞または他の試料を決定するための方法およびシステムに一般に向けられる。かかる電圧指示タンパク質の例は、以下に詳細に議論されるもの、ならびに、2012年3月1日に国際特許公開番号WO/2012/027358の下で公開された2011年8月23日出願された国際特許出願番号PCT/US11/48793; 2010年8月23日出願された米国特許第61/376,049号; 2010年11月12日に米国特許第61/412,972号; および2011年11月23日出願された米国特許第61/563,337号に記載されるものも含み、その各々の全体が本明細書中に参照により取り込まれ、紙上または電子的に提出されようとなかろうと、それらのいずれかおよび全ての配列を含む。例えば心臓細胞または神経細胞など、電圧または膜透過電位を変えるこ

10

20

30

40

50

とができる細胞を含むいずれか細胞を使用または研究することができるがこれらに限定されない。細胞の他の例は、本明細書または国際出願番号PCT/US11/48793に議論されている。

【0069】

本発明の一側面は、比較的高い開口数を有する対物レンズ、および対象領域への撮像光路中に位置するズームレンズを有する顕微鏡システムなどの光学システムに一般向けられる。典型的には、顕微鏡対物は倍率と集光能力（開口数）の間のトレードオフを提供する。しかしながら、本発明のいくつかの態様において、ズームレンズは高NAの対物レンズが使用された顕微鏡システムにおける撮像光路中に置かれる。以下に詳細に議論されるように、様々な態様は、前記トレードオフを回避することができ、比較的高い開口数を有する対物レンズと対象領域への撮像光路中に位置するズームレンズの両方を使用することができる。

10

【0070】

前置きとして、非限定的な例として、高速、低光レベルの顕微鏡システム200は、図2のブロック図に対する参照と議論される。顕微鏡システム200は、動的蛍光撮像用途などの用途、または本明細書に議論されるような他の用途に使用することができる。例えば、前記システムは、時間的に変化するダイナミクスを顕微鏡レベルおよびサブミリ秒レベルで観察し定量化するいくつかの態様で使用されてもよい。一態様より、顕微鏡システム200は、観察される試料を設置できる対象領域205および機器208を支持する試料を含む。前記システムはさらに、照明光学系230、撮像光学系250、1つまたは2つ以上の放射源210、220、検出器260、およびプロセッサ280を含む。図2に示されるように、前記システムのいくつかの光学構成成分は、いくつかの態様において、照明光学系230および撮像光学系250の両方における成分として働くことができる。これは、対物レンズ310が放射を照明するためのフォーカスレンズおよび撮像レンズの両方として働く図3Aを参照して見ることもできる。

20

【0071】

再び図2を参照すると、対象領域205は、観察される試料を設置できる、いずれか空間的な領域を含んでもよい。様々な態様において、光学対象面または撮像光学系250のための箇所に対象領域205が位置する。試料の対応する拡大画像は、検出器260での撮像光学系によって形成することができる。

30

【0072】

機器208を支持する試料は、対象領域で試料を支持するように構成された好適な装置をいずれも含むことができる。非限定的な例として、機器208を支持する試料は、対象領域205に対して試料を運ぶことができ、かつ対象領域205から試料を運ぶことができる少なくとも1つのマイクロ流体チャンネルを有する、低蛍光ガラスまたはポリマープレート、低蛍光マルチウェルプレート、または低蛍光材料を含むことができる。機器208を支持する試料はまた、いくつかの態様において、マイクロポジショナーおよび/またはナノポジショナーを含むことができ、パッチクランプの支持を任意に備えることができる。例えば、かかるマイクロまたはナノポジショナーは、試料を並行移動または横切って移動させる（例えば、試料の異なる領域を観察するために試料を移動させる、またはマルチウェルプレートの種々のウェルに移動させるなど）ために使用することができる。マイクロまたはナノポジショナーはまた、試料を焦点および焦点外に移動させるためにいくつかの場合に使用することができる。

40

【0073】

いくつかの態様において、試料を支持する機器208は、細胞、生物学的システム、生体などを支持するための環境性の筐体(environmental enclosure)を含む。例えば、環境性の筐体は、温度制御、制御されたガス流、湿度制御、光制御、および/または制御された栄養分の流れを有してもよい。環境制御は、いくつかの実施において、37℃、5%CO₂の環境、または研究された細胞または生物学的システムに依存する他の環境を維持することができる。いくつかの態様において、電氣的遮蔽はまた、例えば、パッチクランプ

50

に干渉することができる電気シグナルを抑制するために、試料を支持する機器 208 によって提供されてもよい。いくつかの態様において、試料の位置、環境制御、流体制御、マイクロ流体制御などのいずれか 1 つまたはその組合せは、自動または半自動制御のためのプロセッサ 280 と接続することができる。さらに、いくつかの態様において、空気流は、対象領域の振動を最小限にするように向けることができる。また、設置は、培地に試験化合物の注射可能で、対象領域 205 における試料に対して温度制御された酸素化培地を流すためのいくつかの場合において行うことができる。

【0074】

検出器 260 は、好適な検出器のいずれであってもよい。例えば、ある態様において、検出器 260 は、低光レベルの光感受性素子のアレイを含む。いくつかの場合において、アレイの各素子は、測定時間間隔または時間域にわたって検出強度レベルを表す出力シグナルを提供するように構成されてもよい。出力シグナルは、例えば、検出器 260 によって検知された光学画像を表すビデオ画像を形成するために、プロセッサ 280 によって認識可能な好適なデータ構造（例えば、複数のデジタルワードを含むデータフレーム）で、提供されてもよい。いくつかの場合において、例えば、検出器 260 によって検知された画像の時間変化を追跡するように、出力シグナルを経時的にプロセッサ 280 に対して繰り返し提供することができる。

10

【0075】

いくつかの態様において、検出器 260 は、CCD アレイまたはカメラまたは電子増倍 CCD (EMCCD) アレイカメラを含む。いくつかの態様において、検出器 260 は、MOSFET アレイまたはカメラを含む。カメラは、例えば、いくつかの態様において約 200 フレーム / 秒より大きい、いくつかの態様において約 500 フレーム / 秒より大きい、さらにいくつかの態様において約 1000 フレーム / 秒よりも大きい高フレーム速度で操作することができる。別の態様において、検出器 260 は、シグナル出力がシグナル処理回路に対して提供される光電子増倍管のアレイまたはアバランシェフォトダイオードのアレイを含む。一態様により、検出器 260 は（小さい関心領域および画素ビニングを使用することによって）最大 2000 フレーム / 秒で動作する Andor iXon+ 860 EMCCD カメラを含む。別の実施では、検出器 260 は、より細かい空間分解能で画像を形成するために使用される、より画素数が大きく、より低いフレーム速度で動作する Andor iXon+ 860 EMCCD カメラを含む。

20

30

【0076】

対象領域 205 を照明するために使用される放射源はいくらでもあってもよい。例えば、図 2 において、複数の放射源 210、220 は、対象領域 205 を照明するために使用される。他の態様において、1 つの放射源、または 2 つまたは 3 つ以上の放射源があってもよい。放射源は、例えばいくつかの態様において約 50 nm 未満、またはいくつかの態様において約 20 nm 未満の放射帯域幅を有する、例えば白色光源または狭帯域である独立した広帯域であってもよい。いくつかの実施において、音響光学チューナブルフィルタ（acousto-optic tunable filter）は、白色光源からの放射帯域を制御下で選択するために使用してもよい。例えば種々の波長帯域で対象領域を照明するために、いくつかまたは全ての放射源を提供することができる。特定の例として、第 1 放射源は、約 400 nm と約 550 nm の間の第 1 波長帯域における第 1 放射を提供してもよく、第 2 放射源は、約 560 nm と約 650 nm の間の第 2 波長帯域の第 2 放射を提供してもよい。

40

【0077】

1 つまたは 2 つ以上の放射源はいくつかの態様においてレーザーであってもよく、または、例えば 1 つまたは 2 つ以上の高輝度発光ダイオード (high-intensity light-emitting diode)、白熱光源などの別の種類の光源であってもよい。例えば、レーザーが光源として使用される場合、約 1 mW と約 1000 mW の間のいずれの値に対するいくつかの実施において、その出力電力は調整可能であってもよい。いくつかの態様において、第 1 放射源は、約 60 mW の出力電力で約 488 nm に中心をもつ第 1 波長帯域における第 1 放射を提供してもよく（例えば、ドイツの Omicron Laserage of Dudenhofen から入手可能な Om

50

icron PhoxX 488-60 laser)、第2放射源は、約100mWの出力電力で約640nmに中心をもつ第2波長帯域における第2放射を提供してもよい。(例えば、ネバダ州リノのCrystal Laserから入手可能なモデルレーザー、ウルトラステイブルオプション、DL638-100-0)。

【0078】

放射源の1つまたは2つ以上が、いくつかの態様において、調整可能であってもよい。いくつかの態様において、試料中の蛍光の励起に対して特定な放射帯域は、フィルターまたは光源の調整によって1つまたは2つ以上の放射源から選択可能であってもよい。例えば、1つまたは2つ以上の放射源は、広帯域の波長にかけて放射を出力することができ、チューナブルフィルター(例えば、音響光学チューナブルフィルター)は、レーザーの出力から特定の励起帯域を選択するために使用してもよい。チューナブルフィルターは、いくつかの実施において、例えば、約1MHzより大きい周波数または約1マイクロ秒未満のオン/オフ速度などの高速でレーザーの強度を調整するために使用することができる。いくつかの態様において、1つまたは2つ以上の放射源は、プロセッサ280によって通信接続281、282を介して制御することができる。

【0079】

プロセッサ280は、1つまたは2つ以上のマイクロプロセッサを含み得る、および/または1つまたは2つ以上の光学システム200の動作を管理するように構成されたマイクロコントローラーを含むことができ、検出器260からのデータを受信し、処理することができる。プロセッサ280は、いくつかの場合において、少なくとも1つのデータ記憶装置、1つまたは2つ以上のデータ通信ポート、および/またはユーザーインターフェースを含んでもよい。いくつかの態様において、プロセッサ280は、パーソナルコンピュータまたはラップトップコンピュータなどのコンピュータを含むことができる。いくつかの態様より、プロセッサ280は、コンピュータとインターフェースするように構成された1つまたは2つ以上のマイクロコントローラーを含んでもよい。ある態様において、データ記憶デバイスは、システム200に含まれてもよく、および/または周辺機器および/または取り外し可能な記憶媒体として統合することができる。様々な態様において、プロセッサ280は、機械可読命令および/またはシステム制御の機能性を実行するためのハードウェアおよび/または本明細書に記載のデータ処理で適合される。いくつかの態様において、プロセッサ280は生データを蓄積するように、またはその後処理および表示のために検索することができる、部分的に処理された生データを蓄積するように構成されてもよい。いくつかの態様において、プロセッサ280は、例えばインターネット接続または無線接続を介して、ネットワーク接続によって遠隔操作されるように構成されてもよい。システム200によって得られたデータは、その後の処理および/またはディスプレイのためにネットワーク接続を介して転送することができる。

【0080】

照明光学系230は、1つまたは2つ以上の放射源(例えば図2における210、220)からの放射を直接的に対象領域205に向ける、1つまたは2つ以上の光学構成成分を含んでもよい。いくつかの態様に従い、照明光学系230は、対象領域205上に複数の放射源の可変焦点を結合し、かつ/または提供する。高照明強度(小焦点スポット)および/または広視野照明(大焦点スポット)を提供するために可変焦点は一定の場合に使用することができる。いくつかの態様において、焦点スポットは、約50ミクロンと約500ミクロンの間で変えることができ、約40W/cm²と約4000W/cm²の間の照明強度において対応する変化を提供する。少なくともいくつかの例において、放射源からの出力を制御することによって、さらに強度を変化させることができる。

【0081】

図3Aを参照すると、一態様により、落射照明のために照明光学系230を構成してもよい。照明光学系230は、非限定的な本例において、対象領域205で照明スポットの大きさをユーザーが選択することを可能にする可変倍率ズームレンズ343を含む。ズームレンズ343は、1つまたは2つ以上の放射源210(S1)、220(S2)、およ

10

20

30

40

50

び対象領域上に放射の焦点を合わせる集光光学系の間に配置する。各源からの放射は、照明光路に従うように、例えばダイクロイック光学系 D 4 と組み合わせてもよい。ダイクロイック光学系 D 4 は、例えば、第 1 波長を反射し、ズームレンズ 3 4 3 に向かう第 2 波長を伝えることができる。いくつかの態様において、これらのミラーを省略してもよいし、レーザーをダイクロイック光学系 D 4 に夫々の出力を向けるように調節可能に置いてもよいが、照明光学系 2 3 0 は、例えば、放射を源 S 1、S 2 からダイクロイック光学系 D 4 に向けるミラー 3 0 5、3 0 7 など追加のミラーを含むことができる。

【0082】

いくつかの態様において、照明光学系 2 3 0 は、デジタルマイクロミラーデバイス (DMD) を含むことができ、例えば、ミラー 3 0 7 はデジタルマイクロミラーであってもよい。一態様より、1 放射源からの放射は、DMD に反射されてもよいし、照明光路に沿って向けてもよい。DMD の画素の活性化は、照明光路から逸らして放射ビームの一部を反射することができ、放射ビームにパターンを付与することができる。パターン化された放射ビームは、空間的にパターン化された試料の照明を形成するために、対象領域上に結像することができる。いくつかの態様において、DMD の画像が対象領域 2 0 5 において形成されるような照明光路における画像面で DMD を配置することができる。他の態様において、例えば、DMD のフーリエ変換が対象領域 2 0 5 において形成されるようなミラー 3 0 3 の位置など、照明光路におけるフーリエ面で DMD が配置されてもよい。フーリエ平面に位置する場合、対象領域における所望の画像のフーリエ変換を、DMD によって、放射ビームに付与することができる。空間的にパターン化された照明は、細胞の、例えば、細胞、生物有機体などの選択された部分などの試料の部分の励起するために使用することができる。

【0083】

図 3 A の例に示すように、集束光学系 L I は、ズームレンズ 3 4 3 の前の照明光路中に配置されてもよい。一態様より、集束光学系 L I およびズームレンズ 3 4 3 は、レンズ L 1 / ズームレンズ 3 4 3 対を通過する各放射ビームの可変膨張を提供する。いくつかの態様において、ズームレンズ 3 4 3 は、約 1 8 mm ~ 約 2 0 0 mm の間で可変焦点距離および約 3 . 6 と約 6 . 3 の間の可変 F 値を提供する。ズームレンズ 3 4 3 は、一例として、米国ロンコンコマ、ニューヨークの Sigma から入手可能な Sigma 18-200 mm F3.5-6.3 DC レンズであってもよい。

【0084】

いくつかの態様により、ズームレンズ 3 4 3 は、後述される可変倍率撮像光学系と協調して働くように構成されてもよい。例えば、ズームレンズ 3 4 3 は、高倍率で小さい照明焦点スポットが生じ、低倍率で大きな焦点スポットが生じるような、撮像倍率の調整に回答するように調整してもよい。いくつかの態様において、低および高倍率で一定の照明強度 (W / cm) を維持するように、放射源を調整することもできる。

【0085】

照明光学系 2 3 0 は、いくつかの場合において、ズームレンズ 3 4 3 の後の照明光路中に位置する第 2 レンズ対 L 2、L 3 によって提供される追加のビーム拡大光学系をさらに含むことができる。反射ミラー 3 0 3 は、図 3 A に示される照明光路を折り返す、いくつかの態様において使用することができるが、他の態様において、反射ミラー 3 0 3 は省略してもよく、照明光路は実質的に直線であってもよく、例えば、後述する撮像光路に対して実質的に並行であってもよい。いくつかの態様において、例えばピンホールなどの空間フィルターは、両方の放射ビームからの空間的な高周波構成成分を除去するために、レンズ L 2 と L 3 の間の焦点領域に位置してもよい。いくつかの実施において、レンズ L I、L 2、および L 3 は無色二重レンズである。

【0086】

照明光学系 2 3 0 は、反射ミラー M 1、集光レンズ L 4、マルチクロイックファイバ D 1、図 3 A の例に描写される対物レンズ 3 1 0 をさらに含むことができる。反射ミラー M 1 は、調整機構 (例えば、手動ノブまたは器具制御アクチュエーターなど) を含んでもよ

く、例えば対物レンズ 310 を横切った転換など、対象領域に近い照明ビームの転換を第一に提供するように、対象領域 205 からの十分に離れた距離で配置できる。集光レンズ L4 は、無色二重レンズであってもよく、対物への照明ビームの入り口で対物 310 の入口開口よりも小さい値に照明ビームウェストを減少させるために配置されてもよい。

【0087】

マルチクロイック光学系 D1 は、1 つまたは 2 つ以上の波長帯域の照明放射を対象領域 205 へ向けるために使用される、いくつかの態様において選択的に設計されてもよく、システム 200 の撮像光路に沿って 1 つまたは 2 つ以上の波長帯域の蛍光放射を伝えてもよい。一態様より、マルチクロイック光学系 D1 が四重(quad)帯域フィルターを含む。光学系 D1 および対物 310 は、照明光学系 230 および撮像光学系 250 の両方で共通または共有されてもよい。

10

【0088】

図 3 B に描写されるように、本発明のある態様に従って、ミラー M1 の調整は照明の種類を変化させることができる。例えば、第 1 の位置における場合、ミラー M1 は、通常または従来の落射照明を提供する通常の照明経路 250 に沿って照明ビームを向けることができる。第二の位置に調整した場合、ミラー M1 は、薄層照明経路 352 に沿って照明ビームを向けることができ、対象領域 205 において、対物を貫通し近傍に入射する薄層照明を提供する。第三の位置に調整した場合、ミラー M1 は、全反射経路 354 に沿って照明ビームを向けることができ、対象領域における対物を貫通する全反射蛍光(TIRF)照明を提供する。薄層および TIRF 照明は、対象領域における焦点外の物質からの不要な蛍光の寄与を低減するために使用してもよい。ゴミや焦点外の蛍光物質の非存在下で、従来の落射蛍光照明は、十分なシグナル対ノイズ比を提供することができる。

20

【0089】

対物レンズ 310 は、例えば高品質の顕微鏡または複数の光学系構成部品を有する蛍光顕微鏡の対物レンズであってもよい。対物 310 は、例えば、いくつかの態様において約 20 倍の倍率、いくつかの態様において約 20 倍よりも大きい、いくつかの態様において約 40 倍よりも大きい、いくつかの態様において約 50 倍よりも大きい、さらにいくつかの態様において約 60 倍である、好適な倍率をいずれも提供できる。一態様において、対物 310 は、約 100 倍の倍率を提供することができる。対物レンズ 310 は、対物レンズを油浸対物レンズまたは漬水(water dipping)対物レンズとしての使用のために構成することができ、約 0.9 よりも大きい開口数(NA)を提供する。より高い NA 値は、対象領域から収集された放射量を増加させる。いくつかの態様において、対物レンズは、約 1.0 よりも大きい、いくつかの場合において約 1.1 よりも大きい、いくつかの場合において約 1.2 よりも大きい、いくつかの場合において約 1.3 よりも大きい、さらにいくつかの実施において約 1.4 よりも大きい NA を提供する。1 つの非限定的な例として、前記対物レンズは、ペンシルバニア州センターバレーの Olympus America から入手可能な約 1.45 の NA を提供する油浸レンズである、Olympus objective, model 1-U2B616, 60x を具備してもよい。

30

【0090】

例えば正立、倒立などの好適な構成のいずれも顕微鏡システムのために使用してもよい。いくつかの態様より、一例として、顕微鏡システム 200 は、図 3 A に描写されるように、落射側照明を提供する倒立型顕微鏡として構成することができる。かかる構成によって、環境制御、流体制御、試料交換、および/またはパッチクランプの用途の使用を可能にする十分な作業空間を上側からの対象領域の近くに残すことができる。図 3 B は、対物 310 および対象領域の 1 つの構成を描写する。油または水は、対物 310 と試料プレート 320 の間に配置できる。観察される試料 325 は、例えばマイクロ流体チャンネルのウェルの液滴における、プレート上の流体 330 であってもよい。照明放射は、対物を通過し、試料を照明することができる。試料からの蛍光は、対物によって収集し、システム 200 の画像検出面に向けることができる。

40

【0091】

50

再び図3Aを参照すると、撮像光学系250は、上述のように、対物310およびマルチクロイック光学D1を具備することができる。撮像光学系は、本図に描写されるように、撮像光路におけるズームレンズ344をさらに具備することができる。ズームレンズは、一定の場合において、対象領域205において試料の撮像を連続可変倍率で提供するように構成されてもよい。例えば、ズームレンズ344は、対物に触れずに約10倍と66倍の間で連続的に可変な撮像倍率を提供するために使用してもよい。一態様より、ズームレンズは、約18mm~約200mmの間で可変焦点距離、および、約3.6と約5.6の間で可変F値を提供する。ズームレンズ344は、非限定的な一例として、ニューヨーク州メルヴィルのNikonから入手可能な18-200mm f/3.5-5.6G IF-ED 1レンズとしてもよい。

10

【0092】

撮像光学系250におけるズームレンズの使用は、ある態様において、高効率で蛍光の集光を可能とし、一方で大きな視野も提供する。するための例では、視野は、細胞の少なくとも一部、またはいくつかの場合においては細胞全体を撮像するために十分に大きくてもよい。特定の例として、視野は、神経細胞全体およびその生物学的プロセス（例えば、軸索、樹状突起など）を含んでもよい。

【0093】

さらに、いくつかの場合において、撮像システムは、ユーザーが研究試料に触れたり影響を与えたりせずに（例えば、細胞にパッチクランプの接続を維持したまま）倍率を変更することを可能にする。いくつかの場合において、図3Aに示されるように、撮像光学系およびズームレンズ344は、2つの波長帯域に視野を分割することができ、本明細書に記載されるように、画像の両半分の位置合わせ(registration)を変更することなく、倍率を変更することができる。

20

【0094】

いくつかの態様において、撮像経路中にズームレンズを格納するために、図3Aの例に示されるように、リレー光学系342は対物レンズ310とズームレンズ344の間に配置されてもよい。一態様より、リレー光学系は、画像を対物レンズ310からズームレンズ344の入射開口または入射瞳付近の位置に中継するように構成された無色二重レンズ対L5、L6を具備することができる。リレー光学系342は、対物レンズ310から発散放射を向けることができるが、そうでなければ、ズームレンズ344を見逃し、ズームレンズに失われるであろう。回転ミラー302は、空間の考慮のため、いくつかの態様において経路を折り返すように撮像経路中に配置することができる。別の態様において、回転ミラー302を省略してもよく、撮像光路は対物レンズから直線的に、例えば照明光路に実質的に平行に作られてもよい。リレー光学系342の要素の直径は、対物レンズ310の背面開口部から出射する実質的に全ての光を捕捉し、かつ画像に最小の収差を導入するために選択される。

30

【0095】

ある態様において、いくつかの態様において、上述した検出器260はズームレンズ344に続く画像面に配置されてもよいが、撮像光学系250はズームレンズ344の後に配置された分割視野、ダイクロイック、画像捕捉機器348をさらに具備することができる。いくつかの態様において、分割視野、ダイクロイック、画像捕捉機器348は、ズームレンズ344に続く画像面に実質的に位置する調整可能なスリット346を含むことができる。画像面およびスリットの画像は、いくつかの場合において、レンズ対L7~L8およびL7~L9によって、検出器260への2つの経路（図3AのEMCCDとして示される）に沿って中継することができる。撮像ビームは、一定の場合において、レンズL7の後に配置されるダイクロイックミラーD2によって色を基準に分割することができる。例えば、D2は選択された波長（例えば、約660nm）よりも短い波長を反射してもよいし、選択された波長よりも長い波長を伝えることができる。分割された画像は、所望の蛍光帯域外の放射を遮断するように選択される狭帯域フィルタF1およびF2を通してすることができる。撮像ビームは、次に、検出器260で2つの画像が形成されるような

40

50

第2のダイクロイックミラーD3を使用して再結合することができる。いくつかの態様において、各々の2つの画像が検出器の撮像アレイの実質的に半分を充填するように、スリットは調整される。この様式で異なる波長の蛍光の並んだ画像を同時に観察することができる。非限定的な例として、一態様において、例えば、GF Pのような蛍光団からの蛍光およびVIPは、分割視野、ダイクロイック、画像捕捉機器348で同時に見ることができる。

【0096】

回転ミラーM2およびM3は、いくつかの態様において、各々の撮像経路中に具備し、検出器アレイ上の各画像を置くための調整を含むことができる。分割視野、ダイクロイック、画像捕捉機器348は、いくつかの態様において、ほんの僅かな再構成で容易に単一帯域および二重帯域の撮像の間で変換することができる。例えば、スリット346を広げることができ、2つ撮像ビーム経路のうちの1つは遮断することができる。反射ミラーM2またはM3は、次に、検出器260で検出器アレイ上に画像を中心に位置するように調整することができる。

10

【0097】

一態様より、図3Aに描写されるシステム300の光学系構成部品のためのパラメータは、以下のリストに記載される。本リストは例のために提供するに過ぎず、本発明を限定するものではない。

照明源：S1 - 488 nm、60 mW (Omicron PhoxX)。S2 - 640 nm、100 mW (CrystaLaser, DL638-100-0, ウルトラステイブルオブション)。

20

ダイクロイックミラー：D1 - 405/488/561/635 四重経路 (Semrock)。D2, D3 - 662 長経路、撮像平坦性 (Semrock)。D4 - 503 長経路 (Semrock)。

広帯域ミラー：M1, M2 および M3 は 2" 広帯域誘電体ミラーである。示した他のミラーは全て 1"である。

固定レンズ(全て無色二重レンズ)：L1 - 1" f = 25 mm、L2 - 1" f = 60 mm、L3 2" f = 150 mm、L4, L6, L7, L8, L9 - 2" f = 100 mm、L5 - 1" f = 100 mm。

フィルター：F1 - 700/75 帯域通過 (Chroma)。F2 - 580/60 帯域通過 (Chroma)。

ズームレンズ：Z1 - 18-200 mm f/3.5-6.3 (Sigma)。Z2 - 18-200mm f/3.6-5.6 (Nikon)。

対物：Olympus 1-U2B616 60X oil NA 1.45。

30

【0098】

III. 顕微鏡システムによる動的プロセスの観察

上記の顕微鏡システム200は、例えば一定の種類の細胞における電気的活動などの動的な生物学的プロセスなど、高速プロセスを観察し捕捉するために、VIPと併せて使用することができる。いくつかの種類の細胞(例えば、神経細胞または心臓細胞)における電気的スパイクのタイミング、および電気的スパイクの伝搬における細胞内ダイナミクスは、本発明のある態様に従って観察することができる。さらに、電圧によって誘発される蛍光の変動は、いくつかの態様において、多くの細胞種の過度に密な画像内の単一細胞を識別するために使用することができる。

40

【0099】

本データの細胞における電気的活動の顕微鏡による光学的記録は、対象を捕捉し分析する。急速なダイナミクスを顕微鏡レベルで観察することの挑戦の1つは、既存のEMCCDカメラが128×128画素の画素分解能で500フレーム/秒未満のフレーム速度、または1000フレーム/秒で64×64画素の分解能でデータを取得することである。しかし、細胞における電気的活動は、例えば活動電位が1msのオーダーで続くように、比較において速くすることができる。したがって、多くのカメラは、一定の種類の事象を観察する時間的な精度を十分持っていない。

【0100】

非限定的な例として、図4A～図4Cに描写されるVIPを使用して神経細胞における活動電位の展開を追跡したい場合がある。図4Aは、細胞体410および複数の軸索末端

50

を有する神経細胞を描写する。例えば、1つまたは2つ以上の軸索に沿って細胞体410から軸索末端へ伝播するように、VIPを介して蛍光を刺激するかもしれない活動電位の展開を追跡したい場合がある。高い時間分解能によって、かかる事象は、光斜線部分420、430、440が、活動電位が神経細胞内に伝播するようにVIP仲介蛍光の展開を描写することを意味する、図4B~4Cに描写するように見えるかもしれない。しかし、それらのフレーム速度の制限のため、多くのカメラは、かかる速い電氣的活動の細胞内ダイナミクスを観察するために十分な時間分解能を欠く。

【0101】

したがって、本発明の別の側面は、動画像を時間分解することに一般に向けられる。下記のシステムおよび方法は、本明細書で議論される顕微鏡システムおよび/またはVIPと併せて使用することができるが、それらはそのように限定されない。他の態様において、本明細書で議論されるシステムおよび方法は、動画像を取得するための時間域またはフレーム速度未満である分解能や精度で、動画像を時間分解するために使用することができる。つまり、本明細書において詳細に議論されるように、動画像の時間超分解能を得ることができる。ある態様において、動画像のシグナル値を既定義の時間波形に対してフィッティングすることによって、時間超分解能を得ることができ、例えば、当該アルゴリズムは、既知または疑われる、分解されるべき動的現象の時間的なプロファイルを利用する。

【0102】

一例として、活動電位の時間超分解能について記述する。本例において、カメラなどの検出器から収集されたデータは、細胞内ダイナミクスを明らかにするために開発された時間超分解能アルゴリズムに従って処理することができる。しかし、これは単なる例に過ぎないことが理解されるべきであり、本発明の他の態様において、他の種類の動画像を分析することができる。当該試料は、神経細胞である必要はなく、例えば心臓細胞または他の細胞など、生物学的試料、または他の試料のいずれかであってもよい。例えば、本明細書に議論されるように、高速化学反応を高時間分解能で画像化することができる。さらに、本明細書で議論されるシステムおよび方法は、蛍光画像を検出することのみに限定されるものではないことが理解されるべきである。他の種類の顕微鏡画像、または他の種類の画像もまた高時間分解能で研究することができる。例として、磁気共鳴撮像、X線撮像、(例えば、顕微鏡または非顕微鏡の)ビデオ画像などを含むが、これらに限定されない。時間域またはフレーム速度を使用して取得される動画像のいずれかも、本発明の様々な態様において研究されてもよい。いくつかの場合において、後述するように、動画像は、動画像内に捕捉された動的現象のための既知または疑わしい時間プロファイルを使用して研究することができる。例えば、時間プロファイルが実際に知られていない場合、ガウス分布などの推定されたプロファイルを本発明のある態様に従って使用することができる。

【0103】

前述のように、本例は、活動電位が神経細胞内に伝播するようにVIP仲介蛍光の展開を図示する。活動電位の時間経過は、先験的におよそ知られており、その波形は少なくともものための一定の種類の神経細胞に対して図5Aに描写されるものとおよそ同じである。活動電位がVIPおよび上述の顕微鏡システムを使用した高速カメラ(または他の好適な検出器)によって記録される場合、当該カメラの各画素は、検出器内の画素に対する積分時間によって制限される時間分解能で波形(試料の対応領域からの蛍光発光を積分)をサンプリングする。積分時間はまた、測定「時間間隔」または測定「時間域」と呼ぶこともでき、これは、各画素につき、当該カメラのフレーム速度の逆数にほぼ等しくてもよく、低分解能(64×64画素)で動作する高速カメラの約1msである。これは、時間域を規則的に時間的に離してもよいが、これは必要条件ではないことに留意すべきである;いくつかの場合において、不規則な時間域もまた使用してもよい。

【0104】

本例において、活動電位の波形510は、検出器260によって離散化され、図5Bに描写するように、離散的な値520-1~520-6のシーケンスとして現れてもよい。活動電位が細胞内で迅速に伝播する場合に、カメラまたは他の検出器のフレーム速度で作

成された比較的低い時間分解能が存在すると仮定すると、全体の細胞は、細胞において同時にどこでも同じ時間発展にしたがうように現れることはなく、細胞内ダイナミクスは、かかる検出器を使用して分解されないであろう。

【0105】

しかし、活動電位の波形510が知られるため、基礎となる波形510を、例えば、波形の開始、ピーク値、半ピーク値、ピークの幅、ゼロ交差値などのフィッティングパラメーターとして波形の1つまたは2つ以上のパラメーターを使用して、画素のいくつかまたは全てにつき、測定された離散化データにフィッティングすることができる。いくつかの態様において、反復される測定は、例えば実質的に同一である、例えば反復される動事象に関する試料において、離散化データ520-1~520-6の平均値を得るために取

10

【0106】

各画素で記録されたシグナル値に対して基礎となる波形をフィッティング後、波形によって特徴付けられた事象の発生は、本発明の一部の態様において決定することができる。例えば、波形におけるピーク(図5Bにおいて描写される時間 T_p で発生する F_p)の発生は、測定時間間隔 T_m よりもはるかに高い分解能 T_{sm} に対してフィッティングされた波形510から決定することができる。他の事象の発生は、例えば、活動電位の開始、電位のゼロ交差などの時間波形の知識に基づいて決定することができる。

20

【0107】

基本となる波形510のために使用される特定の形状は、本発明のある態様においては、必ずしも重大ではない。いくつかの場合において、時間的な基本となる波形が知られていない場合であっても、または選択された基礎となる波形が正しくない場合であっても、時間超分解能を生じさせるために波形の形状を使用することができる。他の態様において、基礎となる波形が試料にわたって変化することは先験的に知られてもよく(例えば、位置の関数として、またはその他の事象の数の関数などとして変化する)、それに応じてフィッティング波形を変化させることができる。いくつかの態様において、ガウス波形を使用してもよく、一態様においてローレンツ波形を使用してもよく、一態様において対数正規波形を使用してもよく、一態様において1つまたは2つ以上の指数を含む波形を使用してもよい。生物学的プロセス、または観察されるプロセスを表すことが知られる様々な波形は、測定されたシグナル値に対してフィッティングすることができることが理解されるであろう。いくつかの場合において、いくつかのケースでは、動的事象の時間的なプロファイルが確実には知られていない場合であっても、本明細書に議論されるように、動的事象の時間的なプロファイルの推定を使用することによって動的事象はまだ研究することができる。例えば、ガウス、ローレンツ、または対数正規などの時間波形は、時間波形それ自体についてほとんど知られていない場合であっても、例えば事象の知識が有限時間にか

30

40

【0108】

いくつかの場合において、使用される波形は一定のオフセット、例えば、図5Cに示すようにバックグラウンドシグナルを示すオフセット F_p を含むことができる。測定されたシグナル値520-0から520-8は、バックグラウンドからの寄与を含み、そのため、波形510はバックグラウンド上に乗る。他の場合において、バックグラウンドシグナル値はデータに対して波形をフィッティングする前に測定されたデータから差し引くことができる。

【0109】

50

新しい「動画」または一連の動画画は、本発明のいくつかの態様において、フィッティングの結果を使用して動画画から作り出してもよい。このことは、例えば、動事象の可視化に有用であり得る。一態様より、測定時間間隔 T_m はサブ間隔 T_{s_m} および数値的に生成された各サブ間隔のシグナル値に細分することができる。 T_{s_m} は、波形における事象の発生が知られた不確実性に対応することができ、記録されたシグナル値のシグナル対ノイズの質に依存し得る。いくつかの態様において、 T_{s_m} は、 T_m の約 $1/3$ と T_m の約 $1/8$ の間であってもよい。いくつかの態様において、 T_{s_m} は、 T_m の約 $1/8$ と T_m の約 $1/20$ の間であってもよい。いくつかの態様において、 T_{s_m} は、 T_m の約 $1/20$ と T_m の約 $1/50$ の間であってもよい。いくつかの態様において、 T_{s_m} は、 T_m の約 $1/50$ と T_m の約 $1/100$ の間であってもよい。いくつかの態様において、 T_{s_m} は、 T_m の約 $1/100$ と T_m の約 $1/200$ の間であってもよい。いくつかの態様において、 T_{s_m} は、 T_m の約 $1/200$ と T_m の約 $1/500$ の間であってもよい。新規な映像は、例えばビデオモニター、サブ間隔につき生成された少なくともいくつかのシグナル値のシーケンスを含むビデオデータ上にシーケンシャルな表示を含むことができる。新作な映像の時間分解能が、カメラのはるかに高速なフレーム速度に対応するであろうことが理解されるであろう。例えば、動画画が、フレーム当たり約 1 ms の測定時間間隔 T_m で記録され、上記の方法を使用することによって動画画が T_m の $1/100$ 程度まで時間分解できる場合、カメラの有効または同等のフレーム率は、約 $100,000$ フレーム/秒になるだろう。したがって、映像は、元の動画画と比較して時間超分解能を有するだろう。

10

20

【0110】

様々な態様において、各サブ間隔につき、および各撮像素子に対応して新しいデータ値を生成することができる。一態様より、各サブ間隔につきデータ値は、図5Dに示す基礎となる波形510の値に対応することができる。新規な映像は、各画素、サブ間隔につき生成されたデータ値のシーケンスに関連して表示することを含むであろう。理解されるように、記録された動画画の時間分解能は、約 T_m から約 T_{s_m} まで改善する。

【0111】

いくつかの態様において、基礎となる波形で特徴付けられる事象の発生以外の場合において、時間間隔または時間域のシグナル値は、図5Eおよび5Fに描写される波形未満に抑えることができる。例として、基礎となる波形で特徴付けられた事象は、波形のピークであってよい。すべての生成されたシグナル値は、ピーク近傍を除いて、ヌル値または既選択の値まで抑えることができる。ピークの近くで、シグナル値は、図5Eに描写するように、ピーク値 F_p 、またはスケーリングされたピーク値まで上昇することができる。一態様より、全てのシグナル値は、図5Fに描写するピーク値を除く時間間隔で抑制することができる。この場合、フィッティングされた波形のピークに対応する時間でフラッシュが表示される場合がある。

30

【0112】

別のある態様において、期待される時間波形に十分に対応しない事象は除外または抑制することができる。このことは、例えば、動画画における「ノイズ」、例えば関心のある時間事象の一部ではないシグナル、を低減または排除することに有用であり得、したがって、さらなる検討から除外することができる。例えば、期待される時間波形の約半分未満または約3分の1未満の持続時間を有する事象は、疑わしいノイズであるとして、さらなる検討から除外することができた。同様に、いくつかの場合において、期待される時間波形の2、3、または4倍の持続時間よりも大きい持続時間を有する事象は、さらなる検討から除外することができた。

40

【0113】

いくつかの態様において、生成されたシグナル値の抑制は、各画素につき記録されたバックグラウンドシグナル値までであってもよい。バックグラウンドシグナル値は、測定試行の前、間、または後に取得してもよい。例えば、バックグラウンドシグナルは、観察される動的プロセスの非存在下において各画素につき平均シグナルであってもよい。動的プ

50

ロセスの動映像を表示する場合、平均バックグラウンドレベルまでシグナルを抑制することによって、試料の画像を維持できる。

【0114】

1つの実施において、例えば、特徴的事象が受信されたシグナル値の測定間隔 T_m 内で発生しない場合、または、期待した通りに特徴的事象が発生しない場合、受信した各種シグナル値は、上記のいずれかの方法でも抑制することができる。かかる実施において、元の動画像は、同じ画素および時間分解能で中継することができるが、少なくともいくつかの受信されたシグナル値は抑制される。

【0115】

シグナル値を抑制することは、特徴的事象が発生する場合を除き、速い動的プロセスのための顕微鏡システムの時空間分解能を改善できる。例えば、それは、試料全体にわたって活動電位などの波形のピークまたは頂上の追跡を可能にする。この様式で、高い空間的および時間的な分解能を有する動画像を生成、記録、および表示することができる。図4B~4Dでおおよそ描写された時間発展は、本発明の一態様より、動的な生物学的プロセスの時空間的な動映像にほぼ類似するだろう。

【0116】

上記のフィッティングの手順は、いくつかの態様において、より高いシグナル対ノイズ比から利益を得ることができる。いくつかの態様において、単一試行の測定は、正確な時間超分解能を提供するために十分なシグナル対ノイズ比を欠く。この場合、複数の試行の記録された映像は、十分なシグナル対ノイズ比を有する平均化された映像を作成するために時間的に登録し、一緒に平均化することができ、次に、波形のフィッティングおよび時間的および/またはプロセスの時空間超分解能映像の生成に使用することができる。いくつかの動的なプロセスは高速であってもよいので、例えば、少なくとも本発明のいくつかの態様において、数十、数百、または数千の数ミリ秒の活動電位の試行でさえ、数秒以内に実施できる。

【0117】

一態様より、シグナル対ノイズの質を改善するために試料について事象（例えば、複数の活動電位応答）の複数の動画像を記録してもよい。複数の事象は、記録することができ、共通の基準の場合には登録することができ、さらに、シグナル対ノイズ比を増大させるために組み合わせることができる（例えば、合計または平均化できる）。一例において、各活動電位の応答は、約30フレーム継続できる。AP応答の約100の映像は記録することができ、事象に対応する30フレームの断片の各々を抽出することができる。次に、断片は、例えばAPの初期励起、APの最大値、APの立ち上がりの端で選択されたシグナル値などの共通の基準に時間的に登録することができる。次に、断片は「平均」APの30フレームの映像を作成するために一緒に平均化することができる。次に、波形のフィッティングは平均化された映像を使用することによって行うことができる。いくつかの態様において、観測される事象は、30フレームより大きい、または未満である持続時間（例えば、約30~約100の間、約100~約200の間、約200~約500の間、または、約10~約30の間、約4~約10の間）を有してもよく、平均化のために記録された映像の数は100よりも大きい、または未満（約100~約200の間、約200~約500の間、約500~約1000の間、約50~約100の間、約20~約50の間、約10~約20の間、約2~約10の間）であってもよい。

【0118】

図6は、フロー図によって、動画像を時間分解するための方法600の一態様を図示する。既に議論されたように、本方法の多様性は、本発明の他の態様においても可能である。本例において、本方法は、複数の撮像画素、動画像が得られる間の複数の測定時間域に関連する複数のシグナル値から610を受信する行為を含む。時間域は、撮像画素に関連するシグナル積分時間であってもよい。この方法はさらに、各画素につき630、既定義の時間波形を各画素につき受信された夫々のシグナル値に対してフィッティングする行為をさらに含むことができる。

10

20

30

40

50

【0119】

いくつかの態様より、方法600は、各画素につき、波形によって特徴付けられる事象のときの発生率の決定650をさらに含む。例えば、フィッティングされた波形のピークの発生率は、フィッティングに基づいて決定することができる。各画素につきシグナル積分時間未満の測定間隔に対応する複数の追加シグナル値の各画素の生成670の行為をさらに含んでもよい。例えば図5Dに描写される基礎となる波形をおよそ追跡することなど、生成されたシグナル値は動画像の時間発展を表すことができる。いくつかの態様において、例えば、図5Eまたは図5Fに描写するフィッティングされた波形における特徴的な事象を強調するなど、生成されたシグナル値は動画像の時間発展を表さない場合もあり得る。

10

【0120】

方法600は、動画像を表示する場合、および測定した動画像の時間分解されたビデオの表示695の場合に事象が発生しなかった、時間域での受信したシグナル値または生成したシグナル値の抑制690の行為をさらに任意に含んでもよい。シグナル値の抑制690は、フィッティングされた波形を表す値未満の値までであってもよい。いくつかの態様において、抑制されたシグナル値は、ゼロシグナルレベルまたはバックグラウンドシグナルレベルまででもよい。前記表示は、時間分解された動画像のビデオモニターにビデオを表示することを任意に含んでもよい。前記方法は、いくつかの態様において、後の検索およびさらなるデータ分析のためのデータ記憶装置において時間分解された動画像を蓄積することをさらに含んでもよい。

20

【0121】

前述の通り、上記の議論は、本明細書および一定のVIPで議論されるように顕微鏡システムと併せて神経細胞の決定との関連において行われたが、そのように限定されると理解されるべきではない。様々な態様において、本明細書で議論される前記システムおよび方法は、動画像を取得するために使用される時間域またはフレームレート未満である分解能または精度でのいずれか動画像を時間分解するために使用してもよい。

【0122】

IV. 電圧指示タンパク質の分析のシステムおよび方法

前述したように、本発明のいくつかの側面は、電圧指示タンパク質(VIP)を使用して、細胞または他の試料の様々な特性を研究するためのシステムおよび方法に一般に向けられる。例えば、ある態様において、本明細書に議論されるシステムおよび方法は、1つの非限定的な例として、膜電位または細胞または他の生物学的試料の電氣的挙動を調節することが疑われる薬物または他の薬剤をスクリーニングするために使用することができる。いくつかの場合において、例えば潜在的な薬物または他の薬剤に対するそれらの応答を決定するために様々な生物学的プロセスを研究することができる。一定の場合において、かかる研究は、例えば、細胞または生体試料中のミクロンレベルの分解能以下のミリ秒以下のダイナミクスを含んでもよい。

30

【0123】

他の用途の範囲は、hERGアンタゴニスト(hERGはカリウムイオンチャンネルである)または心毒性のためのアッセイ;神経細胞のイオンチャンネルの調節因子;心臓のイオンチャンネルの調節因子;および幹細胞を増殖および分化へ向ける化合物を含むが、これらに限定されない。本明細書に記載の部分は、神経細胞におけるVIPの使用に向けられるが、これは単なる例であることが理解されるであろうし、他の態様において、他のVIPは、顕微鏡システムと組み合わせて、例えば本明細書に記載されるように、心筋細胞、免疫細胞、膵臓ベータ細胞などの他の電氣的に活性な細胞のために使用できる。

40

【0124】

例えば、ある態様において、細胞(またはその部分)は励起または刺激されてもよく、例えば細胞の電圧または膜電位など、細胞の応答を決定することができる。例えば、細胞またはその一部は励起または刺激されてもよく、細胞の電圧または膜電位は、細胞が刺激された後に、空間および/または時の関数として決定することができる。ある態様におい

50

て、例えば細胞の約 75 % 以下、約 50 % 以下、約 25 % 以下、または約 10 % 以下を、例えば本明細書で議論されるように、刺激することができる。特定の非限定的な例として、神経細胞の特定の部分（例えば軸索、樹状突起、細胞体など）を例えば脱分極化など刺激でき、神経細胞の電圧または膜電位の刺激に対する応答を研究できる。別の非限定的な例として、心臓細胞を刺激することができ、例えば心臓細胞または組織内の電気シグナルの伝達を決定するために、刺激に応答した心臓細胞の電圧または膜電位を研究することができる。いくつかの場合において、細胞は薬物または他の医薬剤（例えば、潜在的な薬物または医薬剤の存在下における細胞の挙動を決定するスクリーニングアッセイにおける、潜在的な薬物または医薬剤を含む）に曝しながら試験することができる。

【0125】

10

ある態様において、細胞（またはその一部）は、感光部分を使用して刺激することができる。感光部分は、刺激するか、またはそうでない場合は細胞と相互作用するために光に対して反応できる部分のいずれであってもよい。例えば細胞の電圧または膜電位の変化などの細胞の電気的特性の変化を生じさせるために光を使用することができる。例えば、光は感光部分に適用することができ、それに応答して実体は感光部分によって放出され、光感受性反応が生じ、イオンチャンネルの開閉などが起こり得る。ある態様において、電圧指示タンパク質および感光部分は、各々、細胞内に含まれている。例えば、一方または両方が細胞の原形質膜に存在してもよい。

【0126】

20

したがって、ある態様において、細胞（または他の試料）は、電圧指示タンパク質および感光部分を含んでもよい。電圧指示タンパク質および感光部分は細胞内（例えば原形質膜内）で別々に存在していてもよく、および / または電圧指示タンパク質と感光部分は相互に連結され、例えば、相互に共有結合されるか、または融合タンパク質を形成するために一緒に融合される。光は、例えばイオンチャンネルの開閉およびイオン輸送の増減など、感光部分に適用してもよく、実体などの放出を引き起こす。いくつかの場合において、感光部分に対する光の照射は、細胞内の電圧または膜電位を変化させるために使用することができる。いくつかの場合において、電圧または膜電位の変化は、例えば本明細書で議論するように蛍光を使用して、電圧指示タンパク質を決定することによって決定することができる。

【0127】

30

例えば、ある態様において、感光部分は、光ゲートイオンチャンネルである。典型的には、光ゲートイオンチャンネルは、孔を含むか、または光に応答して開閉することができる「チャンネル」を含むタンパク質である。光ゲートイオンチャンネルは、いくつかの場合において、膜貫通タンパク質でもよい。光ゲートイオンチャンネルの特定の非限定的な例は、チャンネルロドプシン（例えば、チャンネルロドプシン - 1、チャンネルロドプシン - 2、またはボルボックスチャンネルロドプシン）を含む。光ゲートイオンチャンネルは、イオン輸送を増加または減少させることができる。

【0128】

40

特定の非限定的な例として、一定のチャンネルロドプシンは青色光を用いて励起され、励起光が照射される場合、イオン輸送を増加させる。例えば、チャンネルロドプシン（または他の感光性イオンチャンネル）を活性化するために適用した前記光は約 460 nm と約 480 nm の間の波長、例えば、約 470 nm を有してもよい。いくつかの場合において、前記光は、実質的にコヒーレントであってもよく（例えばレーザー光）、かつ / または前記光は平均波長の周辺の約 ± 50 nm 以下、約 ± 20 nm 以下、約 ± 5 nm 以下、または約 ± 5 nm 以下の波長分布を有してもよい。他の態様において、他の励起波長を使用することができる。

【0129】

50

感光部分の別の例は、例えば、正イオンを外に、または負イオンを内にポンプして細胞内の電気的活動を抑制することによって、細胞を過分極することができる光駆動ポンプである。非限定的な例は、ハロロドプシン、アーキアロドプシン、光受容体タンパク質（例

えば、ロドプシン、フィトクロム、バクテリオロドプシン、またはバクテリオフィトクロム)を含む。したがって光は細胞を過分極するために適用することができる。例えば、ハロロドプシンまたはアーキアロドプシンなどのロドプシンに黄色光を適用することができる。例えば、光は約560nmと約580nmの間の波長、例えば約570nmを有してもよい。

【0130】

感光部分のさらなる別の例として、ケージド(caged)部分は、細胞の電圧または膜電位の変化を引き起こすことができる、神経伝達物質を放出または伝達するために使用することができる。特定の非限定的な例として、ケージドグルタミン酸は、グルタミン酸が紫外線への露光によって「アンケージド(uncaged)」とすることができる細胞に適用することができる。ケージドグルタミン酸の例は、例えば約355nm、または約350nmと約360nmの間の波長を有する紫外光を使用してアンケージドすることが可能である、単一のケージドグルタミン酸(例えば、ガンマ-(アルファ-カルボキシニトロベンジル)-グルタミン酸)または二重のケージドグルタミン酸塩(例えば、アルファ,ガンマ-ビス-(アルファ-カルボキシニトロベンジル)-グルタミン酸)を含む。

10

【0131】

電圧指示タンパク質および感光部分は、好適な技術のいずれかを使用して細胞内に送達または導入することができる。例えば、電圧指示タンパク質および/または感光部分は、膜融合などの技術を使用してインビトロで細胞に送達することができ、または一方または両方を、例えば、電圧指示タンパク質および/または感光部分をコードする核酸を含むベクターを用いたトランスフェクションを使用することによって細胞に導入することができる。いくつかの場合において、一方または両方はまた、原形質膜または細胞内小器官などの特定部位に対してタンパク質を標的化することができる標的配列を含むことができる。非限定的な例として、標的配列はアルファ-2ニコチン性アセチルコリン受容体からのC-末端シグナル配列(MRGTPLLLVVSLFSLQLD; 配列番号1)、小胞体輸送モチーフ(例えば、FCYENEV、配列番号2)、ゴルジ輸送配列(例えば、RSRFVKKDGHCVNFQFINV、配列番号3)または膜局在化配列(例えば、KSRITSEGEYIPLDQIDINV; 配列番号4)を含むことができる。

20

【0132】

細胞の電圧または膜電位は、本明細書で議論するように、電圧感受性状態に入ると、電圧指示タンパク質によって放射される光を使用して、ある態様に従って決定することができる。したがって、いくつかの態様において、1つまたは2つ以上の発光波長を細胞(または他の試料)から決定することができる。いくつかの場合において発光波長は膜電位を示す参照と比較される。いくつかの場合において、決定される光は、約680nmと約700nmの間、例えば約687nmの波長を有してもよい。前記の光はまた、実質的に単色であってもよく、かつ/または光は、平均波長の周辺の約+/-50nm以下、約+/-20nm以下、約+/-5nm以下、または約+/-5nm以下の波長分布を有していてもよい。前述したように、本発明の一定の側面は、電圧指示タンパク質、およびかかる電圧指示タンパク質の製造および使用のためのシステムおよび技術に一般向けられる。

30

【0133】

V. 電圧指示タンパク質

上記の様々な側面は、いくつかの態様において、電圧指示タンパク質(VIP)に一般向けられるか、または含む。電圧指示タンパク質の非限定的な例は、本明細書に記載される2011年8月23日出願された国際特許出願番号PCT/US11/48793(本明細書の付録を参照); 2010年8月23日出願され、2010年11月12日出願された米国特許第61/376,049号; 夫々の全体は本明細書に引用として取り込まれ、紙面上または電子的に提出されようとなかろうと、含まれるいずれかおよび全てのシーケンスを含む。

40

【0134】

電圧指示タンパク質は、いくつかの態様において、微生物ロドプシンタンパク質であってもよい。いくつかの場合において、微生物ロドプシンタンパク質は、シッフ塩基の基端

50

の変異プロトン受容体を含む。かかる電圧指示蛋白質の1つの非限定的な例は、*Halorubrum sodomense*からのアーキアロドプシン3である。タンパク質は、野生型（「WT」）アーキアロドプシン3の形態であってもよく、かつまたは、例えば少なくとも1つのアミノ酸残基の置換によって改変された、改変された形態であってもよい。例えば、前記タンパク質は、少なくとも1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸残基の置換によって改変することができる。いくつかの場合において、前記タンパク質は、少なくとも1個および3個以下のアミノ酸残基の置換によって改変することができる。特定の非限定的な例は、D95N（95番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸からアスパラギンに変異する場合）、D85N（85番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸からアスパラギンに変異する場合）または本明細書中で議論されるような他の変異または本明細書中に参照により取り込まれる国際特許出願番号PCT/US11/48793に記載のものを含む。

10

【0135】

操作された微生物ロドプシンの非限定的な一例を図1Aに示す。描写は脂質二重膜120にまたがるグリーンプロテオロドプシン110のD97N変異体である。前記ロドプシン110はタンパク質のコアに結合したレチニリデン蛍光団130を含む。図1Bは、蛍光団130の拡大図を描写する。蛍光団はシッフ塩基140を介してタンパク質の主鎖に共有結合的に連結する。このロドプシンについて、 λ_{max} の野生型の値から約9.8の値までシッフ塩基140のpKaを減少させるために、野生型構造におけるアスパラギン酸97をアスパラギン150に変異させた。この変異は、プロトンポンプの光サイクルを除外する。

20

【0136】

図1Aのように、ロドプシンが膜中に取り込まれ、かつ膜120全体にわたって電位が印加される場合、局所的な電気化学電位の変化が誘発される。かかる変化は、ロドプシン近傍の酸塩基平衡およびシッフ塩基140のプロトン化に影響を与えることがある。例えば、膜120全体にわたって電位を適用することによって、シッフ塩基140の近くまたは遠方にプロトン160を動かすことができる。レチナール130の吸収スペクトルおよび蛍光は、シッフ塩基140のプロトン化状態に依存する。ある態様において、プロトン化形態は蛍光性であり、脱プロトン化形態は蛍光性ではない。いくつかの態様において、蛍光の量は、図1Cに見られる印加電圧の量に依存する。したがって、いくつかの実施において、試料内の局所的な電圧または電気化学的電圧は、ロドプシンからの蛍光の量を測定することによって決定することができる。

30

【0137】

本明細書で議論するように、電圧指示タンパク質が発する蛍光のレベルは、タンパク質が経験した電圧を示すことができる。ある場合において、蛍光のレベルは、細胞の膜電位または電圧の指標である参照と比較してもよい。例えば、*Halorubrum sodomense*からのアーキアロドプシン3またはその改変体などの微生物ロドプシンタンパク質に対して、細胞は、約594nmと約645nmの間、約625nmと約650nmの間、約525nmと約570nmの間の波長を有する光、または、電圧指示タンパク質が電圧感受性状態になることを可能にする強度および/または周波数を有する他の好適な光のいずれでも照明されてもよい。潜在的に有用な周波数の特定の非限定的な例は、約640nm、約633nm、約558nm、約585nm、または約532nmが含まれる。いくつかの場合において、光は、実質的にコヒーレント（例えばレーザー光）であってもよく、かつ/または光が平均波長の周辺の約 ± 50 nm以下、約 ± 20 nm以下、約 ± 5 nm以下、または約 ± 5 nm以下の波長分布を有してもよい。

40

【0138】

微生物ロドプシンは、一般に7回膜貫通ドメイン、およびタンパク質のコアにおいてシッフ塩基を介してリジンに結合したレチニリデン蛍光団によって典型的に特徴付けられるタンパク質の大きなクラスである。5,000以上の微生物ロドプシンが知られており、これらのタンパク質は、生物の全ての界で見出される。微生物ロドプシンは、それらのホストに対して様々な機能を果たす：いくつかは光駆動プロトンポンプ（バクテリオロドプ

50

シン、プロテオロドプシン)、他は光駆動イオンチャンネル(チャンネルロドプシン)、塩素ポンプ(ハロロドプシン)であり、または純粹に光センサー容量として働く(感受性ロドプシン)。レチニリデン蛍光団は珍しい光学特性を有する微生物ロドプシンに普及している。レチナルの線形および非線形の応答はタンパク質ホストとの相互作用に高い感受性であり得る: 静電環境における小さな変化は、吸収スペクトルに大きな変化をもたらすことができる。これらの電気光学カップリングは、微生物ロドプシンにおける電圧感受性のための基礎を提供する。

【0139】

本明細書に記載された電圧指示タンパク質のいくつかは、改変のない自然なタンパク質であり、真核細胞などの細胞へのトランスフェクションされた微生物ロドプシンを通常発現しない細胞において使用される。例えば、野生型 Arch3 は、膜電位およびその変化を特異的に検出する神経細胞において使用することができる。

10

【0140】

本明細書で使用される電圧指示タンパク質のいくつかは、ロドプシタンパク質の光誘発イオンポンプを減らすか、または阻害するように当該タンパク質を改変した微生物ロドプシタンパク質に由来する。かかる改変は、改変された微生物ロドプシタンパク質が、その天然のイオンポンプ活性を有する細胞の膜電位を変化させることなく電圧を感知することを可能にし、したがって当該システムの電圧を変化させる。他の変異は、増加した蛍光の明るさ、改善された光安定性、感受性および電圧応答のダイナミックレンジの調整、増加した応答速度、および/または吸収および発光スペクトルの調整などを含む、微生物ロドプシン電圧センサーに対して他の有利な特性を付与する。

20

【0141】

微生物ロドプシンのポンプを除外する変異は、シッフ塩基のカウンターイオン;ロドプシタンパク質の第3膜貫通ヘリックス(ヘリックスC)に保存されたカルボキシアミノ酸(AspまたはGlu)への変異を含む。アミノ酸配列は、Xが非保存アミノ酸である、RYX(DE)である。カルボキシ残基への変異は、プロトン伝導経路に影響を及ぼすことがあり、プロトンポンプを除外する。他の変異も可能であるが、最も典型的には、変異は、AsnまたはGlnへのものである。したがって、本発明のいくつかの態様は、微生物ロドプシタンパク質によって低減または不在のイオンポンプをもたらす変異体に一般向けられる。一態様において、改変された微生物ロドプシタンパク質は、AspからAsnまたはGlnへの変異、またはGluからAsnまたはGlnへの変異を含む。いくつかの態様において、タンパク質はAspからAsnまたはGlnへの変異、またはGluからAsnまたはGlnへの変異から本質的になる。いくつかの態様において、タンパク質はAspからAsnまたはGlnへの変異、またはGluからAsnまたはGlnへの変異からなる。

30

【0142】

表1aは、本発明のある態様において有用な代表的な微生物ロドプシンを含む。例えば、微生物ロドプシンにおいてポンプを除外する変異はシッフ塩基カウンターイオンへの変異;ロドプシタンパク質の第3膜貫通ヘリックス(ヘリックスC)に保存されたカルボキシアミノ酸(AspまたはGlu)を一般に含む。表1aは、代表的なGenbankまたは配列番号として提供される配列中のアミノ酸位置を指す。しかし、当該位置は、利用可能なアミノ酸配列の多様性に基づいて、わずかに異なる可能性がある。本明細書に記載のモチーフの記載に基づいて、本発明の他の態様は、同じ機能的特色、すなわち問題の微生物ロドプシンのポンプ活性の減少、を達成するために他の微生物ロドプシン遺伝子への同様な変異に向けられる。

40

【0143】

【表 1 a】

表 1 a. 本発明の有用な代表的な微生物ロドプシン				
微生物 ロドプシン	略称	Genbank 番号	アミノ酸変異	
緑吸収プロテオ ロドプシン：海洋 微生物に見出さ れた光駆動プロ トンポンプ	G P R	AF349983；野生型、（ 配列番号 5～6 とし て夫々開示されるヌ クレオチドおよびタ ンパク質）	本明細書において D 9 9 N（配列番 号 7）、本変異は D 9 7 N も指す。	10
青吸収プロテオ ロドプシン：海洋 微生物に見出さ れた光駆動プロ トンポンプ	B P R	AF349981；野生型、（ 配列番号 8～9 とし て夫々開示されるヌ クレオチドおよびタ ンパク質）	D 9 9 N（配列番 号 1 0）	
Natronomonas pharaonis の感受性 ロドプシン I I：好 塩性微生物 N. pharaonis に見出さ れた光駆動シグナル タンパク質。天然で は、感受性ドメイン はトランスデューサ ードメインと対になる。	N p S R I I	Z35086.1； 一態様において、配 列 Z35086 のヌクレ オチド 2112～2831 によって与えられ る感受性ドメイン のみが使用される （配列番号 1 1～1 2 として夫々開示 されるヌクレオチド および「感受性ドメ イン」タンパク質）。	D 7 5 N（配列番 号 1 3）	20
バクテリオロドプ シン： Halobacterium salinarum に見出 された光駆動プロ トンポンプ	B R	NC_010364.1、ヌク レオチド 1082241～ 1083029、または GenBank 配列 M11720.1；（配列番 号 1 4～1 5 とし て夫々開示される 「M11720.1」ヌクレ オチドおよびタン パク質）	D 9 8 N （配列番号 1 6）	30
アーキアロドプシ ン Arch 3： Halobacterium sodomense に見出さ れた光駆動プロト ンポンプ	A r c h 3（ または A r 3 ）	Chow B.Y. et al., Nature 463:98-102 ；（配列番号 1 7 と して開示される「A r c h 3」野生型タ ンパク質）	D 9 5 N（配列番 号 1 8）	40

【 0 1 4 4 】

次の表 1 b は、本発明のいくつかの態様において変異させ、使用することができる代表的な追加のロドプシンを含む。

【表 1 b】

表 1 b				
微生物ロドプシン	略称	Genbank 番号	核酸変異	アミノ酸変異
真菌オプシン関連タンパク質	M a c	AAG01180 (配列番号 19)	G 4 1 5 ~ A	D 1 3 9 N (配列番号 20)
クルックスロドプシン (Cruxrhodopsin)	C r u x	BAA06678 (配列番号 21)	G 2 4 7 ~ A	D 8 3 N (配列番号 22)

10

表 1 b				
微生物ロドプシン	略称	Genbank 番号	核酸変異	アミノ酸変異
藻類バクテリオロドプシン	A c e	AAV82897 (配列番号 23)	G 2 6 5 ~ A	D 8 9 N (配列番号 24)
アーキアロドプシン 1	A r 1	P69051 (配列番号 25)	G 2 8 9 ~ A	D 9 7 N (配列番号 26)
アーキアロドプシン 2	A r 2	P29563 (配列番号 27)	G 2 8 6 ~ A	D 9 6 N (配列番号 28)
アーキアロドプシン 3	A r 3	P96787 (配列番号 29)	G 2 8 3 ~ A	D 9 5 N (配列番号 30)
アーキアロドプシン 4	A r 4	AAG42454 (配列番号 31)	G 2 9 2 ~ A	D 9 8 N (配列番号 32)

20

【 0 1 4 5 】

30

議論されたように、発明のある態様は、電圧指示タンパク質 (「VIP」) に一般向けられる。ある態様において、電圧指示タンパク質は、アーキアロドプシンに基づく蛍光の電圧指示タンパク質 (VIP) のファミリーのタンパク質のいずれも含む。タンパク質は、いくつかの態様において、神経細胞およびヒト幹細胞由来の心筋細胞を含む、哺乳動物細胞において機能することができる。これらのタンパク質は、サブミリ秒の時間分解能およびサブミクロンの空間分解能で電気的なダイナミクスを示すことができる。本発明のある態様において、例えば本明細書に議論されるように膜電位の光学的測定を使用して、電圧指示タンパク質は、非接触、高いスループット性、および / または高含量の哺乳動物細胞および組織における電気的なダイナミクスの研究を示す。これらのVIPは、例えばヒト細胞を含む哺乳動物細胞などの真核細胞において、様々な用途に広く有用である。

40

【 0 1 4 6 】

いくつかの態様において、VIPはアーキアロドプシン 3 (Arch3) および / またはそのホモログに基づいてもよい。Arch3はH. sodomenseからのアーキアロドプシンであり、遺伝的にコードされた高性能な黄 / 緑光の神経サイレンシングのための試薬として知られる。GenBank : GU045593.1 (2009年9月28日提出の合成コンストラクトArch3遺伝子、完全cds) の遺伝子配列。いくつかの場合において、これらのタンパク質は、真核細胞における原形質膜に局在し、電圧依存性の蛍光を示す。

【 0 1 4 7 】

ある態様において、VIPは、GenBank : HM367071.1 (2010年5月27日提出の合成コンストラクトArchT遺伝子、完全cds) の遺伝子配列のArchTにおいて、

50

同等な電圧感受性で、さらに改良された膜局在を示すことができる。ArchTは、Arch3よりも3.5倍感光性が高く、Halorubrum sp. TP009：遺伝的にコードされた高性能な黄／緑光の神経サイレンシングのための試薬、からのアーキアロドブシンである。

【0148】

電圧指示タンパク質の他の例は、プロテオロドブシン光学プロトンセンサー（PROPS）、Arch3 WT、およびArch3 D95Nを含む。例えば、ある態様において、PROPSは、細菌において使用してもよく、一方でArch3 WTおよびArch3 D95Nは、哺乳動物細胞において使用してもよい。

【0149】

表2は、蛍光の電圧指示タンパク質の代表的なおよその特性を示し、蛍光指示薬の全てのファミリーの代表的なメンバーを含む。

【表 2】

表 2：蛍光指示薬の全てのファミリーの代表的なメンバー			
分子	100mV毎の およその $\Delta F/F$	およその応答時間	注釈
VSFP 2.3, Knopfel, T. et al. J. Neurosci. 30, 14998-15004 (2010)	9.5%	78 ms	レシオメトリック ($\Delta R/R$)
VSFP 2.4 Knopfel, T. et al. J. Neurosci. 30, 14998-15004 (2010)	8.9%	72 ms	レシオメトリック ($\Delta R/R$)
VSFP 3.1, Lundby, A., et al., PLoS One 3, 2514 (2008)	3%	1-20 ms	タンパク質
Mermaid, Perron, A. et al. Front Mol Neurosci. 2, 1-8 (2009)	9.2%	76	レシオメトリック ($\Delta R/R$)
SPARC, Ataka, K. &	0.5%	0.8 ms	タンパク質

表 2：蛍光指示薬の全てのファミリーの代表的なメンバー			
分子	100mV毎の およその $\Delta F/F$	およその応答時間	注釈
Picribone, V. A. Biophys. J. 82, 509- 516 (2002)			
Flash, Siegel, M. S. & Isacoff, E. Y. Neuron 19, 735-741 (1997)	5.1%	2.8 – 85 ms	タンパク質
本明細書に記載の PROPS；配列番号	150%	5 ms	タンパク質
本明細書に記載の Arch3 WT	66%	< 0.5 ms	タンパク質
Arch D95N	100%	41 ms	タンパク質

【0150】

一態様において、緑の吸収プロテオロドプシン（GPR）は出発分子として使用される。この分子は、比較的赤にシフトした吸収スペクトルおよび大腸菌などの異種ホストにおける発現の容易さのために選択される。別の態様において、青色吸収プロテオロドプシン（BPR）は、電圧の光学センサーとして使用される。本明細書に記載されるように、天然で見出される微生物ロドプシンのかなりの数を、光学電圧センサーとして働くように操作することができると本明細書において意図される。

【0151】

微生物ロドプシンは電圧以外の数量に敏感である。本明細書に記載される GPR および

10

20

30

40

50

B P R の変異体は、細胞内の p H にも敏感である。また、ハロロドプシンの変異体は局所的な塩化物濃度に敏感であり得ると意図される。

【 0 1 5 2 】

一態様において、電圧センサーは、吸収または蛍光の電圧誘発シフトを提供する微生物ロドプシントタンパク質（野生型または変異体）から選択される。これらのコンストラクトを操作することができる出発配列は、ロドプシンおよびタンパク質産物の性能を増強する遺伝子を作製することができる代表的な変異を一覧で記載する表 1 a ~ 1 b において一覧で記載された配列を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 5 3 】

本発明のいくつかの態様は、光誘発の電荷ポンプ能力を最小化するための変異に一般に向けられる。例えば、いくつかの態様において、レチナール蛍光団をシッフ塩基によってリジンに連結することができる。保存されたアスパラギン酸は、シッフ塩基に近接したプロトン受容体として働く。このアスパラギン酸からアスパラギンへの変異は、プロトンポンプを抑制する。したがって、いくつかの態様において、変異は、以下：D 9 7 N（緑色吸収性プロテオロドプシン）、D 9 9 N（青色吸収プロテオロドプシン）、D 7 5 N（感受性ロドプシン I I）、および D 8 5 N（バクテリオロドプシン）からなる群から選択される。他の態様において、ポンプを阻害するために変異させることができる残基は、（バクテリオロドプシンの番号付けを使用）D 9 6、Y 1 9 9、および R 8 2、ならびに他の微生物ロドプシンにおけるそれらのホモログを含む。別の態様において、残基 D 9 5 は、プロトンポンプを阻害するようにアーキアロドプシンにおいて変異させることができる（例えば D 9 5 N）。

【 0 1 5 4 】

本発明のある態様は、吸収および発光スペクトルを所望の範囲にシフトさせるために導入される変異に一般に向けられる。結合ポケット付近の残基は、所望の吸収および発光波長にスペクトルを調整するために単独でまたは組み合わせて変異させることができる。バクテリオロドプシンにおいて、これらの残基は L 9 2、W 8 6、W 1 8 2、D 2 1 2、I 1 1 9、および M 1 4 5 を含むが、これらに限定されない。相同な残基は、他の微生物ロドプシンにおいて変異させてもよい。したがって、いくつかの態様において、微生物ロドプシントタンパク質を改変する変異は、L 9 2、W 8 6、W 1 8 2、D 2 1 2、I I 1 1 9、または M 1 4 5 からなる群から選択される残基で行われる。

【 0 1 5 5 】

本発明のある態様は、所望の帯域に電圧感受性のダイナミックレンジをシフトさせるために導入される変異に一般に向けられる。かかる変異は、シッフ塩基の近傍における電荷の分布をシフトすることによって機能し、それによってこのグループからプロトンを追加または除去するために必要な電圧を変化させる。緑色吸収性プロテオロドプシンにおける電圧をシフトさせる変異は、一例として、緑色吸収性プロテオロドプシンの位置、または別のロドプシンにおける相同な残基を使用して、E 1 0 8 Q、E 1 4 2 Q、L 2 1 7 D、単独または組み合わせを含むが、これらに限定されない。一態様において、D 9 5 N 変異は、シッフ塩基の p K a を中性 p H に向けて調節するためにアーキアロドプシン 3 に導入される。

【 0 1 5 6 】

本発明のある態様は、蛍光の明るさおよび光安定性を増強させるために導入された変異に一般に向けられる。変異した場合に蛍光を増加させるために結合ポケットを制限することができる残基は、Y 1 9 9、Y 5 7、P 4 9、V 2 1 3、および V 4 8 を含むが（バクテリオロドプシンの番号付けを使用）、これらに限定されない。

【 0 1 5 7 】

例えば、一組の態様は、G P R に由来する光遺伝的電圧センサーである、P R O P S に一般に向けられる。G P R はその光サイクルにおいて通過する 7 つの分光学的に識別可能な状態を有する。原則として、状態のいずれかの対の間の遷移は膜電位に敏感である。一態様において、シッフ塩基の酸塩基平衡は、波長がシフトする遷移として選択され、した

10

20

30

40

50

がってセンサーの名前は：プロテオロドプシン光学プロトンセンサー（PROPS）である。

【0158】

PROPSの簡潔な説明は以下の通りである。一態様において、単一の点変異は、シッフ塩基の pK_a が、周囲の pH に近い値まで-12の野生型の値からシフトすることができる、GPRにおける変化を誘発する。 pK_a が pH に近い場合、プロトン化の状態は、膜電位に最大限に敏感になる。さらに、最適には電圧プローブは研究中の量を混乱されないため、内因性電荷ポンプ能力は除去することができる。Asp97からAsnへの変異は、シッフ塩基近くの負電荷を除外し、シッフ塩基のプロトンを不安定化させる。 pK_a は約12から9.8にシフトする。野生型GPRにおいて、Asp97は、光サイクルの第一工程において、プロトン受容体としても働くため、このアミノ酸の除去はプロトンポンプを除外する。

10

【0159】

別の態様において、BPRに由来する相同な電圧センサーにおいて、Asp99からAsnへの相同変異はシッフ塩基の pK_a を低下させ、プロトンポンプ光サイクルを除外する。したがって、一態様において、VIPは、アミノ酸残基Asp99がAsnに変異されたBPRに由来する。

【0160】

GPRにおいて、追加の変異は pK_a を7.4の生理学的な値付近へシフトさせる。特に、Glu108のGlnへの変異とGlu142のGlnへの変異は個別に、または組み合わせて、 pK_a の減少、および電圧に対する感受性のさらなる増大をもたらす。ここで議論されたもの以外の多くの変異は、追加の pK_a の変化およびPROPSの光学的特性の改善につながる可能性があり、かつ本明細書で意図される。

20

【0161】

いくつかの場合において、蛍光はVIPを検出するために使用してもよい。例えば、多くの微生物ロドプシタンパク質およびそれらの変異体（本明細書に記載されたものを含む）は、測定可能な蛍光を生じさせる。例えば、PROPSの蛍光は、500と650nmの波長間の波長で励起され、発光は710nmでピークに達する。PROPSの光退色の速度は、より長い励起波長で減少するため、励起波長の一例は633nm付近のスペクトルの赤色部分に存在する。これらの波長は、他のいかなる蛍光タンパク質の励起および発光波長よりも赤色をさらに上回り、インビボ撮像のための極めて所望の特性である。さらに、PROPSの蛍光は無視できる光退色を示す。633nmで励起された場合、PROPSはおよびGFPは、光退色の前に同等な数の光子を発する。したがって、微生物ロドプシンは光安定、膜結合蛍光マーカーとして使用することができる。

30

【0162】

いくつかの場合において、PROPSの蛍光は、プロトン化した形態のみが蛍光を発するという点で、シッフ塩基のプロトン化の状態に敏感であり得る。したがってある態様において、電圧によって誘発されたプロトン化の変化は、蛍光の変化につながる。いくつかの態様において、PROPSの蛍光は、例えば、蛍光顕微鏡、蛍光プレートリーダー、蛍光の細胞をソートリングするFACSなどを使用して検出される。

40

【0163】

電圧指示タンパク質が発する蛍光も、ある態様において参照値と比較することができる。本発明は、別のある態様において、微生物ロドプシタンパク質をコードする核酸を発現する細胞における膜電位を測定するためのシステムおよび方法を提供する。いくつかの態様において、当該方法は、微生物ロドプシタンパク質をコードする核酸を含む少なくとも1つの細胞を少なくとも1つの波長の光で励起し、少なくとも1つの細胞からの少なくとも1つの光学シグナルを検出する工程を含む。いくつかの場合において、参照と比較した少なくとも1つの細胞が発する蛍光のレベルは当該細胞の膜電位を示す。

【0164】

本明細書で使用される用語「参照」は本明細書で議論するように、当業者が使用できる

50

、いずれの種類のベースライン値をも参照する。いくつかの態様において、当該参照は、膜電位を変化させることが可能な、または可能であることが疑われる、刺激にさらされていない細胞である。一態様において、当該参照は、微生物ロドプシンでトランスフェクションされたが、異なる時点で観察された細胞と同じである。別の態様において、当該参照は、作動可能に (operably) 微生物ロドプシンに融合した緑色蛍光タンパク質 (GFP) のホモログの蛍光である。

【0165】

ある態様において、本発明は、改変された微生物ロドプシンからの蛍光を検出することに一般向けられる。本発明のいくつかの態様において、細胞は光源で励起されるため、発光された蛍光を検出することができる。励起光の波長は、蛍光分子に依存してもよい。例えば、アーキアロドプシンは、約594 nmと約645 nmの間で変化する波長を有する光を使用して励起されてもよい。いくつかの場合において、当該範囲は約630 nmと約645 nmの間であってもよい。例えば、通常使用されるヘリウム・ネオンレーザーは632.8 nmで発光し、蛍光発光の励起に使用することができる。

10

【0166】

いくつかの態様において、第2の光を使用してもよい。例えば、細胞 (または他の試料) が参照蛍光分子または、pHまたはカルシウム濃度などの細胞の別の特色を検出するために使用される蛍光分子を含んでもよい。いくつかの場合において、第2の波長は第1の波長とは異なる。有用な波長の例は、例えば473 nm、488 nm、514 nm、532 nm、または561 nmなど、約447 nmから約594 nmの範囲の波長を含む。

20

【0167】

いくつかの態様では、深い組織または厚い試料における撮像は、共焦点顕微鏡または側方薄層 (lateral sheet) 照明顕微鏡などの技術を必要としてもよい。いくつかの場合において、深い撮像は、二光子蛍光または二次調波発生 (second harmonic generation) を含む非線形顕微鏡法を必要としてもよい。従来の落射蛍光撮像は、例えば培養液中の細胞のためなど、いくつかの場合に使用することができる。一組の態様において、全反射蛍光 (TIRF) を使用することができる。

【0168】

いくつかの態様において、高速CCD、またはカスタム軌道をスキャンすることができる高速共焦点顕微鏡でサブミリ秒の時間分解能を達成することができる。遅いダイナミクスおよび準定常状態の電圧は、従来のカメラで測定することができる。これらの測定は、例えば、心筋細胞などの心臓細胞における薬剤のスクリーニングに向けられる方法およびアッセイに使用することができる。VIPの決定の他の例は、本明細書で議論される。

30

【0169】

いくつかの場合において、スペクトルシフト蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を、VIPを検出するために使用してもよい。FRETは、タンパク質 - タンパク質相互作用、タンパク質 - DNA相互作用、およびタンパク質立体構造変化などの生物物理学および生化学における分子のダイナミクスを定量化するための有用なツールである。2つの分子間の複合体形成をモニターするために (例えばレチナールと微生物ロドプシン)、それらの1つはドナーで標識され、かつ他方はアクセプターで標識され、これら蛍光団標識分子は混合される。それらが解離される場合、ドナー励起時にドナー発光が検出される。一方、2つの分子の相互作用のためにドナーおよびアクセプターが近接する場合 (1 ~ 10 nm)、ドナーからアクセプターへの分子間FRETのためアクセプター発光が主に観察される。

40

【0170】

いくつかの態様において、微生物ロドプシンに融合された蛍光分子は、例えば、レチナールの吸収スペクトルが蛍光団の発光スペクトルと重複する場合、レチナールにその励起エネルギーを転送することができる。レチナールの吸収スペクトルの変化は、いくつかの場合において蛍光団の蛍光の明るさの変化につながる。スペクトルシフトFRETを行うために、蛍光タンパク質は、微生物ロドプシン電圧センサーと融合してもよく、タンパク

50

質の蛍光はモニターされる。したがって、いくつかの態様において、微生物ロドプシンの吸収スペクトルの電圧誘発の変化は、スペクトルシフト FRET を使用して検出される。

【0171】

電圧指示タンパク質は、増強された明るさおよび / または 2 光子撮像のためのスペクトルシフト FRET (s s FRET)、レシオメトリック電圧撮像、および電圧および / または濃度の同時測定のためのマルチモーダルセンサーを使用して決定することもできる。いくつかの態様において、本発明のシステムは、強い赤色レーザー、高開口数の対物レンズ、および電子増倍 CCD (EMCCD) カメラを含むことができる。しかし他の態様において、VIP は、従来の広視野または共焦点蛍光顕微鏡、またはインビボ用途のための 2 光子共焦点顕微鏡上で撮像するために十分明るい。

10

【0172】

本明細書に議論するように、一定の VIP は、比較的高い感受性を示す。例えば、哺乳動物細胞において、本明細書で議論されるいくつかの VIP は、 -150 mV と $+150\text{ mV}$ の間の蛍光において約 3 倍の増加を示し、応答はこの範囲の大部分にわたって線形である。VIP は 1 s 間隔における $< 1\text{ mV}$ の精度で膜電位を介して測定することができる。

【0173】

いくつかの態様において、本明細書に議論される VIP は、例えば電圧または膜電位の変化に対して高い速度または応答を示す。例えば、Arch3 WT は、 $< 0.5\text{ ms}$ においてステップ応答の 90 % を示す。神経細胞の活動電位は、 1 ms 継続するため、この速度は神経細胞の電気的活動を撮像するためのベンチマーク満たす。いくつかの場合において、Arch3 WT は、光誘発プロトンポンプを保持するため、照明はわずかに細胞を過分極させることができる。

20

【0174】

別の例として、改変された微生物ロドプシン、Arch3 D95N は、 40 ms の応答時間を有し、光誘起プロトンポンプを欠く。Arch3 D95N は、例えば、他の種類の細胞における膜電位および活動電位を示すために使用することができ、例えば、心筋細胞において、それが使用される細胞において膜電位を乱さない。

【0175】

いくつかの態様において、ロドプシン光学ロックイン撮像 (ROLI) は、VIP を検出するために使用することができる。レチナールの多くの状態の吸収スペクトルは、短い光パルスによって時間的に変化する。ROLI において、「ポンプ」ビームの周期的なパルスは試料に送達される。第二の「プローブ」ビームは、当該ポンプビームが光吸光度の大きな変化を誘発する波長で試料の吸光度を測定する。したがって、ポンプビームは、プローブビームの透過強度に周期的な調整を刻印する。これらの周期的な強度変化は、ロックイン撮像システムによって検出される。従来の吸収撮像とは対照的に、ROLI はレチナール特定のコントラストを提供する。高い周波数でのポンプの調整は、吸光度における極めて小さい変化の検出を可能にする。

30

【0176】

ある態様において、ラマン分光法は VIP (VIP コンストラクトであってもよい) を検出するために使用してもよい。ラマン分光法は、振動、回転、およびシステムにおける他の低周波モードを検出することができる技術である。当該技術は単色光 (例えば可視光レーザー、近赤外レーザーまたは近紫外レーザー) の非弾性散乱に依存する。単色光は、当該システムにおける分子の振動、フォノンまたは他の励起と相互作用し、レーザー光子のエネルギーシフトをもたらす。エネルギーのシフトは、当該システムにおけるフォノンモードに関する情報を提供する。微生物ロドプシン分子のレチナールは、強い共鳴ラマンシグナルを有することが知られている。このシグナルは、蛍光団の周りの静電環境に依存し、したがって電圧に敏感である。

40

【0177】

いくつかの態様において、二次調波発生 (SHG) は、VIP (VIP コンストラクト

50

であってもよい)を検出するために使用してもよい。また、「周波数倍増」として当技術分野で公知の二次調波発生は、2倍のエネルギー、したがって初期の光子の2倍の周波数と半分の波長である新しい光子を形成するために、非線形材料と相互作用する光子が効果的に「組み合わせられる」、非線形光学プロセスである。例えば、SHGシグナルは、細胞膜中のバクテリオロドプシンの配向フィルムから観察された。SHGは光電圧センサーにおけるレチナール周辺の静電環境の効果的なプローブである。さらに、SHG撮像は赤外光での励起に関する。したがってSHG撮像は、本明細書に記載される三次元光電圧感知に使用することができる。

【0178】

いくつかの態様において、ロドプシンの状態制御は、VIPでの蛍光撮像において使用することができる。VIPの光励起は、タンパク質の立体構造の遷移を誘発することができる。いくつかの場合において、VIPの光サイクルにおけるただ1つの状態は、電圧感受性状態を示すことができる。電圧感受性状態が暗順応状態であってもよいし、光生成中間体であってもよい。いずれの場合においても、いくつかの態様において、タンパク質が電圧感受性状態にある時間の割合を最大にすることが望まれる。

10

【0179】

「ロドプシンの状態制御」は、タンパク質を励起するために使用される入射光のタイミングおよび選択の慎重な制御によって達成することができる。電圧感受性状態からの蛍光を検出するために、VIPは、選択された第1波長または波長の選択された第1帯域、例えば本明細書で議論される波長、の入射放射で光学的に励起することができる。しかしながら、いくつかの態様において、選択された励起は、他の電圧の非感受性状態にタンパク質を駆動することができる。

20

【0180】

いくつかの態様において、タンパク質の「基底状態」は光感受性でなくてもよい。これらの特性に対抗するために、選択された第2波長または波長の選択された第2帯域の光は、電圧感受性状態へVIPを駆動または「ポンプ」、または戻すために使用することができる。したがって、2つまたは3つ以上の波長または波長帯域で試料を照明することによって(例えばポンププローブの様式で)、タンパク質が電圧感受性状態にある時間の割合は増強され、したがって電圧依存状態から蛍光シグナルレベルを増強する。

【0181】

したがって、いくつかの場合において、電圧感受性状態を再構築するために使用される2次ビームは、不要なバックグラウンド蛍光を生成し得る。不要なバックグラウンド蛍光は、励起とポンプ放射の間で試料照明を急速に変化させることによって軽減される。さらに、時間ゲート検出は、励起照明の間に放出された光子のみを検出するために用いることができる。いくつかの実施において、バックグラウンド蛍光は有意でなくてもよく、ポンプおよび励起放射を同時に適用することができる。

30

【0182】

本発明のある態様は、光シグナルを生じさせる部分との融合タンパク質に一般に向けられる。本明細書で議論される微生物ロドプシンタンパク質または他のVIPは、電圧の変化に応答してそれ自体が蛍光性であるが、いくつかの用途において、電圧変化の検出を可能にするために、蛍光のレベルを増強、または別の光シグナル(例えば比色シグナル)を提供することが望ましい、または必要であり得る。また、光シグナルを生じさせる部分は、VIPの細胞内局在をモニターするためにVIPに取り付けることができる。したがって、いくつかの態様において、VIPはさらに光シグナルを生じさせる部分を含み、それによってVIPから測定された光シグナルを増強またはVIPのために行われる局在化の研究を可能にする。

40

【0183】

例えば、GFPファミリーまたはそのホモログの蛍光タンパク質の遺伝子または他の好適な蛍光団は、VIPをコードする核酸に対して任意に添付、または特許請求の範囲で示されるように、「作動可能に連結」することができる。他の好適な蛍光団の非制限的な例

50

は、YFP、eGFP、eYFP、BFP、eBFB、DsRed、RFPおよびその蛍光変異体を含む。一態様において、蛍光タンパク質の同一性、電圧感知複合体へのリンカー、およびタンパク質全体の配列中の当該位置は、リンカーの当該レベルの指標、遺伝子発現産物の分布として働く、および/またはVIPの内因性蛍光から独立した電圧の代わり読み出しとして働くように選択される。

【0184】

例えば、蛍光タンパク質がタンパク質の局在化の指標として働く場合、発現レベルにおける細胞間の多様性によって混乱しない定量的な光電圧測定を可能にすることができる。例えば、蛍光タンパク質およびVIPの蛍光は同時に測定することができ、これら2つのシグナルの比は、膜電位の濃度依存的な測定を提供する。

10

【0185】

したがって、本発明のある態様は、微生物ロドプシンまたは他のVIP、および、GFPホモログまたは追加あるいは改善された特性を有する他の蛍光団の間の融合の生成に一般向けられる。ある態様において、例えば、VIPは電圧指標としてGFPホモログタンパク質と融合してもよい。付録の図16は、これらのコンストラクトの例を図示し、対応する凡例はこれらのコンストラクトの配列を提供する。したがって、いくつかの態様において、本明細書で議論される電圧指示タンパク質は、他の態様においてVIPは必ずしも改変されなくてもよいが、改変VIP（例えば、追加のまたは改善された特性を有するGFPホモログまたは他のフルオロフォアと融合したVIP）を含むことが理解されるべきである。

20

【0186】

いくつかの態様において、GFPホモログ（一般にGFPという）は、微生物ロドプシンまたは他のVIPに融合する。レチナールの吸収スペクトルの電圧依存性の変化は、GFPとレチナールの間の非放射性的蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の電圧依存的な速度につながり得る。非吸収性、非蛍光状態のレチナールはGFPを消光しない一方、その吸収、蛍光状態のレチナールには、GFPを消光することが可能であってもよい。

【0187】

したがって、一態様において、本発明は微生物ロドプシンまたはプロテオロドプシンやアーキアロドプシンなどの改変された微生物ロドプシンに融合したGFPを含む融合タンパク質を提供する。かかる融合タンパク質は、本発明の様々な態様において記載されるいずれかおよび全ての方法において使用することができる。

30

【0188】

例えば、ある態様において、例えば蛍光タンパク質VenusとPROPSのN末端の融合など、蛍光タンパク質を含むPROPS融合タンパク質に一般向けられる。このタンパク質は、細胞内のPROPSの局在を示し、またはVenusおよびPROPS蛍光のレシオメトリック撮像を可能にする安定な参照を提供するために使用することができる。レシオメトリック撮像は、この技術が細胞内のタンパク質の総量に対して敏感ではないため、膜電位の定量的測定を可能にする。他の蛍光タンパク質は、同様な効果を有するVenusの代わりに使用してもよい。いくつかの態様において、当該蛍光ポリペプチドは、GFP、YFP、EGFP、EYFP、EBFB、DsRed、RFPおよびその蛍光性変異体からなる群から選択される。

40

【0189】

ある態様において、蛍光団を使用することができる。野生型微生物ロドプシンは、光活性エレメントとして働くレチナールの結合分子を含む。これらのタンパク質は、同様な構造およびおそらく良好な光学的特性を有する他の多くの蛍光団の周辺で結合し折り畳む。ロックリング(locked rings)を有するレチナールのアナログはトランス-シス異性化を受けることができず、したがってより高い蛍光量子収率を有する。電子吸引性置換基を有するレチナールのアナログは天然のレチナールよりも低いpKaを有するシッフ塩基を有し、したがって電圧により敏感であり得る。

【0190】

50

本発明のある態様は、他の光学撮像および制御での多重化に一般に向けられる。例えば、いくつかの場合において、VIPの撮像は、例えば、pH、カルシウム、またはATPなどの他の構造的かつ機能的な撮像と組み合わせることができる。VIPの撮像は、例えばチャンネルロドプシン、ハロロドプシン、およびアーキアロドプシンを使用して膜電位の光遺伝的な制御もまたあってもよい。さらに、本発明のある態様は、微生物ロドプシンにおける電圧誘発シフトの分光的な読み出しに一般に向けられる。

【0191】

ある態様において、VIPは、細胞内小器官を標的としてもよい。VIPが標的とすることができる細胞内小器官の例は、ミトコンドリア、小胞体、筋小胞体、シナプス小胞、およびファゴソームを含む。したがって、一態様において、本発明は、例えば、ミトコンドリア、小胞体、筋小胞体、シナプス小胞、またはファゴソームを含む、細胞内小器官へのタンパク質を標的とする配列に作動可能に連結されたVIPを含むウイルスコンストラクトの発現コンストラクトなどのコンストラクトを提供する。本発明は、いくつかの態様において、コンストラクトを発現する細胞、および/または、かかるコンストラクトを発現する細胞において膜電位の変化を測定する方法、ならびに細胞内膜の1つまたは2つ以上の膜電位に影響を与える薬剤のスクリーニング方法を提供する。

10

【0192】

したがって、ある態様において、本明細書で議論されるVIPは高い標的志向性を示す。例えば、いくつかの態様において、本明細書で議論されるように、一定のVIPは、画像の一次神経細胞培養、心筋細胞(HL-1およびヒトiPSC由来)、IEEK細胞、グラム陽性およびグラム陰性菌などを撮像するために使用することができる。例えば、本明細書で議論されるVIPは、小胞体、またはミトコンドリアを標的とすることができる。VIPは、線虫、ゼブラフィッシュ、マウスなどのインビボの撮像にも有用であり得る。

20

【0193】

本発明のある態様は、以下の組織またはプロセスを標的とする薬物のスクリーニングにおけるVIPの用途に一般に向けられる。例えば、本明細書に開示されるVIPは、例えば、神経システムを標的とする薬物などの薬物スクリーニングの方法に使用することができる。特定のイオンチャンネルを発現する細胞の培養液中で、パッチクランプを細胞1つずつに適用する手間なく、アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができる。神経細胞の培養液中において、活動電位の開始、伝播、およびシナプス伝達への薬物の効果を探ることができる。ヒトiPSC由来の神経細胞における用途は、遺伝的に決定された神経性疾患の研究、ならびに環境ストレス(例えば無酸素)に対する応答の研究において使用してもよい。

30

【0194】

同様に、本発明の他の態様において、本明細書で提供されるVIPを使用した光電圧感知は、心臓の活動電位およびその細胞間伝播を調整する薬剤をスクリーニングするための方法を提供する。これらのスクリーニングは候補薬物の安全性の決定、または新しい心臓薬物リードの識別に有用であり得る。HERGの阻害は、長QT間隔症候群(long QT syndrome)を有する患者における心室細動に関連するため、HERGチャンネルと相互作用する薬物を識別することは、特に有望な方向である。ヒトiPSC由来の心筋細胞における用途は、遺伝的に決定された心臓の状態に関する研究、ならびに環境ストレス(例えば無酸素)への応答に関する研究を可能とし得る。

40

【0195】

さらに、本発明のVIPは、いくつかの態様において、発達および創傷治癒を研究するための方法に使用することができる。正常および異常な発達、ならびに組織の修復における電気シグナリングの役割は、あまり理解されていない。本明細書で議論されるVIPは、組織、臓器、および生体の発達または治癒において長い時間にわたって電圧のダイナミクスの研究において使用でき、これらのダイナミクスを調整する薬物につながる。

【0196】

50

さらに別の態様において、本発明は、ミトコンドリアの膜電位に影響を与える薬剤をスクリーニングするためのシステムおよび方法を提供する。ミトコンドリアは、老化、癌、および神経変性疾患において必須な役割を果たす。本明細書に記載のものなどのVIPは、ミトコンドリア膜電位を決定するためのプローブとして使用することができ、ミトコンドリア活性を調整する薬剤の探索において使用することができる。

【0197】

本発明はさらに、別のある態様において、医学的、工業的、および環境的に重要な微生物の広い範囲の電気生理を調整する薬剤をスクリーニングするためのシステムおよび方法を提供する。

【0198】

さらに別のある態様において、本明細書に記載のものなどのVIPは、例えば細菌など原核生物における膜電位を測定するために使用してもよい。いくつかの場合において、細菌は複雑な電氣的ダイナミクスを有する。本明細書に議論されるものなどのVIPは、医学的、工業的、および環境的に重要な微生物の広い範囲の電気生理を調整する薬剤をスクリーニングするために使用することができる。例えば、電氣的活動は、大腸菌における排出ポンプと関連させることができる。

【0199】

膜電位の変化は、マクロファージの活性化にも関連する。しかし、運動性細胞にパッチクランプを適用することが困難であるため、このプロセスはあまり理解されていない。ある態様において、本明細書に記載されるようなVIPは、マクロファージ、および受精能の研究のための精子細胞を含む他の運動性細胞の電気生理の研究において使用できる。したがって、本明細書のVIPは、例えば、免疫および免疫疾患、ならびに生殖能力に影響を与える薬物または薬剤をスクリーニングするためのシステムまたは方法に使用することができる。

【0200】

例えば、一態様において、本発明は、微生物ロドプシンを発現する細胞を、膜電位を変化させることが可能であるか、または可能であることが疑われる刺激に対してさらに露出させる方法を提供する。

【0201】

使用することができる刺激は、薬剤候補、小さな有機および無機分子、より大きな有機分子、および分子のライブラリーならびにこれらの組み合わせなどの候補薬剤を含む。抗生物質などの1つまたは2つ以上の既存の薬剤の有効性を高めることができる薬剤をスクリーニングするために、候補薬剤と抗生物質などの公知の薬物の組み合わせを使用することもできる。

【0202】

本発明のシステムおよび方法は、いくつかの態様において、インビトロの毒性スクリーニングおよび薬物の開発に有用であり得る。例えば、本明細書に記載のシステムおよび方法を使用して、プロトンポンプ活性が実質的に低減または除去された改変アーキアロドプシンを安定的に発現するヒト心筋細胞を誘発された多能性細胞から調製することができる。かかる細胞は、薬物開発におけるインビトロ毒性スクリーニングに特に有用であり得る。

いくつかの態様において、ハイスループットな薬物スクリーニング方法において典型的に遭遇する大規模なライブラリーまたは条件の多数をスクリーニングするために、ロボットおよびカスタムソフトウェアを使用することができる。

【0203】

いくつかの態様において、ハイスループットな薬物スクリーニング方法において典型的に遭遇する大規模なライブラリーまたは条件の多数をスクリーニングするために、ロボットおよびカスタムソフトウェアを使用することができる。

【0204】

一態様において、本明細書に議論されるVIPの遺伝子の設計は、少なくとも3つの要

10

20

30

40

50

素：プロモーター、微生物ロドプシン電圧タンパク質または他の電圧誘導タンパク質（1つまたは2つ以上の標的モチーフ）および任意のアクセサリ蛍光タンパク質の選択、を含むか、からなるか、または、から本質的になる。いくつかの非限定的な例は、これらの要素の各々につき、表1aおよび1b、ならびに表3に一覧で記載される。一態様において、各カラムからの少なくとも1つの要素は、所望の特性を有する光電圧センサーを作成するために選択される。いくつかの態様において、本明細書に記載される電圧感知のための方法および組成物は、以下：1) 細菌ロドプシンタンパク質、2) 電圧または関心の他の量に対する感受性をタンパク質に付与するための、および光駆動電荷ポンプを除外するための1つまたは2つ以上の変異、3) ホストの種に適切なコドン使用頻度、4) 関心の細胞種においてタンパク質を発現させるための、ならびに関心の細胞内構造に対してタンパク質を標的化するためのプロモーターおよび配列、5) レシオメトリック撮像を提供する従来の蛍光タンパク質との任意の融合、6) 微生物ロドプシンに挿入する蛍光団、および7) 光学撮像方式の選択に関する。

【表3】

表3：代表的な光学センサーの組み合わせ			
プロモーター	電圧センサー	標的モチーフ	アクセサリ蛍光タンパク質
CMV（配列番号33）	hGPR（D97N）（配列番号37）	SS（ β 2nAChR）（配列番号41）	Venus（配列番号45）
14xUAS-EIb（配列番号34）	hGPR（D97N, \pm E108Q, \pm E142Q, +L217D）（配列番号38）	SS（PPL）（配列番号42）	EYFP（配列番号46）
HuC（配列番号35）	hBPR（D99N）（配列番号39）	ER輸送モチーフ（配列番号43）	TagRFP（配列番号47）
ara（配列番号36）	hNpSRII（D75N）（配列番号40）	Kir2.1からのTS（配列番号44）	
Iac		MS	

【0205】

微生物ロドプシンの遺伝子（例えばGPR）は大腸菌でよく発現する。一態様において、真核生物における発現を可能にするために、真核生物（例えばヒト）細胞に適したコドン使用頻度を有する遺伝子のバージョンが設計され、合成される。例えばGene Designer 2.0パッケージ（dna20.com/genedesigner2/のワールドワイドウェブ上で利用可能）などの公的に利用可能なソフトウェアを使用していずれか遺伝子についてもこの手順を実施することができる。いくつかの「ヒト化」遺伝子は、本明細書では名前の前に文字「h」を配置することによって、例えばhGPRという。Arch3ロドプシン、ならびに、本明細書および例に記載のその変異体は、全てヒトのコドン使用頻度に最適化される。

【0206】

一態様において、VIP遺伝子は送達ベクターを含む。かかるベクターは、プラスミド（例えばpBADTOPPO、pCI-Neo、pcDNA3.0）、コスミド、およびウ

イルス（レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、またはバキュロウイルスなど）を含むが、これらに限定されない。

【0207】

1つのコドンの別への交換は、当技術分野で公知の標準的な方法を使用して達成することができる。例えば、親のポリヌクレオチドのコドン改変は、例えば、オリゴヌクレオチド指向性誘発変異、縮重オリゴヌクレオチドによる変異誘発、および領域特定の変異を含む。いくつかの既知の変異誘発技術を使用して影響を与えることができる。代表的なインビトロ変異技術は、例えば米国特許第4,184,917号、第4,321,365号、および第4,351,901号またはAusubelら（CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. 1997）およびSambrookら（MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, 1989）の関連箇所に記載される。インビトロ変異の代わりに、合成ポリヌクレオチドは、例えば米国特許第4,293,652号に記載されるように容易に利用可能な機械を使用して新規に合成することができる。しかし、本発明は合成ポリヌクレオチドを構築するためのいずれか1つの特定の技術にも依存せず、かつ向けられないことに留意すべきである。

【0208】

前述のように、本発明のある態様において、膜融合技術は、電圧指示タンパク質および/または発光部分を送達するために使用することができる。ある態様において、本発明は、電圧指示タンパク質の膜融合仲介性送達に一般に向けられる。膜融合反応は、真核細胞において普遍的である。膜は、エンドサイトーシス、オルガネラの形成、オルガネラ間の交通、および恒常的かつ調節されたエキソサイトーシスを含むプロセスにおいて細胞内で融合される。膜融合もまた、細胞膜がリボソーム膜と融合されたりリボソームを使用すること、および、ヘテロカリオンを生じさせるために細胞-細胞融合を誘発する様々な化学物質または脂質によって人工的に誘発された。生体膜の融合を誘発することが示されている天然に存在するタンパク質は、主にエンベロープウイルスの融合タンパク質である。したがって、いくつかの態様において、電圧指示タンパク質は、融合性タンパク質を含むリボソームを使用して投薬される。

【0209】

生体膜の細胞内融合を誘発するために使用され得るタンパク質は、エンベロープウイルスのそれおよび非エンベロープウイルスからの2つのタンパク質を含む。エンベロープウイルスは、細胞膜とウイルスエンベロープとの融合に関与するタンパク質をコードすることができる。これらのウイルスの融合タンパク質は感受性細胞の感染のために使用することができる。エンベロープウイルスからの融合タンパク質の活動のメカニズムは、タンパク質仲介性膜融合のためのパラダイムとして働いた。本明細書で使用する可以使用エンベロープウイルス融合タンパク質の例は、比較的大きい多量体であり、低pHで活性化される融合タンパク質であるインフルエンザウイルスHAタンパク質および中性pHで機能するセンダイウイルスFタンパク質によって典型的に表される、タイプI膜タンパク質を含む。これらはウイルス粒子と細胞膜の間の相互作用を容易にするために、ウイルス粒子の外面上に配向された大部分の融合タンパク質を有するウイルスの構造タンパク質である。

【0210】

エンベロープウイルスからの融合タンパク質の活動のメカニズムより、細胞膜とウイルスのエンベロープの融合は、ウイルス融合タンパク質中に存在する融合ペプチドモチーフと呼ばれる両親媒性アルファヘリックス領域によって仲介される。融合ペプチドモチーフのこのタイプは、典型的に17～28の残基長、疎水性（約0.6±0.1の平均疎水性）であり、典型的には36%±7%の高含有量のグリシンおよびアラニンを含む。

【0211】

エンベロープウイルスの融合タンパク質は、熱力学的障壁を克服するためのエネルギーを供給することにより、膜融合を促進する広範な立体構造変化を介して機能すると考えられる。これらの立体構造変化は、しばしば、多重コイル構造を形成する7アミノ酸(hepta

d) 繰り返し領域によって仲介される。膜融合の始動における融合ペプチドモチーフの重要性の認識は、リポソームと細胞の融合を増強する融合ペプチドモチーフを含む小ペプチドの使用をもたらした。

【0212】

エンベロープウイルスの融合タンパク質は、細胞と細胞の融合を始動するいくつかの態様においても使用することができ、多核細胞（合胞体）の形成をもたらす。感染細胞の内部のウイルス融合タンパク質の合成は、感染細胞からの感染性子孫ウイルス粒子の組み立ておよび出芽に必須の工程である、小胞体ゴルジ輸送系を通じた融合タンパク質の細胞膜への輸送をもたらす。合成、輸送、および融合タンパク質のフォールディングは、細胞内輸送経路、タンパク質へのN連結型糖付加のグリコシル化シグナル、および細胞膜中にタンパク質を固定するための膜貫通ドメインに対して当該タンパク質を標的化させるシグナルペプチドを含む様々な構成成分によって容易にされ得る。これらのタンパク質は、細胞培養液およびインビボの両方における増強されたタンパク質仲介リポソーム-細胞融合のために、再構成されたプロテオリポソーム（「ピロソーム」）において使用された。

【0213】

したがって、本明細書に記載の方法および組成物のいくつかの態様において、ミセル、リポソームまたは電圧指示タンパク質を含む他の人工膜は細胞に投薬される。一態様において、組成物はさらに、特定の細胞型に送達システムを標的化させる標的化配列を含む。望まれる場合、人工膜組成物の外因性脂質は、侵入を容易にするために哺乳動物細胞に結合する標的化部分（例えばリガンド）をさらに含むことができる。例えば組成物は、哺乳動物のレクチンに結合するアシアロ糖タンパク質（例えば肝臓のアシアロ糖タンパク質受容体）をリガンドとして含むことができ、哺乳動物細胞への侵入を容易にする。特定の細胞表面マーカーを標的とすることができる単鎖抗体もまた、本明細書では標的部分としての使用として意図される。標的部分は、例えば、薬物、受容体、抗体、抗体断片、アプタマー、ペプチド、ビタミン、炭水化物、タンパク質、接着分子、糖タンパク質、糖残基またはグリコサミノグリカン、治療薬、薬物、またはこれらの組み合わせを含むことができる。

【0214】

膜融合媒介送達を使用する方法について、本発明のいくつかの態様において、使用する電圧指示タンパク質は異種発現系において発現され生じると意図される。光センサーの発現のための本明細書に記載される光センサーまたは誘導体をコードする核酸を含む種々の発現ベクターは様々な細胞の型または種類との使用のために作製できる。発現ベクターは、例えばプロモーター配列、リポソーム認識およびTATAボックスなどの、必要な5'上流および3'下流の調節因子、および所望の細胞における効率的な遺伝子転写および翻訳のための転写終了配列3'UTR AAUAAAを有するべきである。いくつかの態様において、光センサーは、異種タンパク質発現システムにおいて作製され、次に所望の細胞型との融合のための脂質仲介送達薬剤の生成のために精製される。かかる態様において、発現ベクターは、6X-ヒスチジン、V5、チオレドキシン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、c-Myc、VSV-G、HSV、FLAG、マルトース結合ペプチド、金属結合ペプチド、HA、および、精製の簡便のために発現された組換え光センサーに取り込まれる「分泌」シグナル（例えばミツバチメリチンPho、BiP）などの追加の配列を有することができる。さらに、それらが必要とされない後に追加の配列の酵素的除去を容易にするために、これらの配列の後に取り込まれた酵素消化部位が存在し得る。これらの追加の配列は、光センサー発現の検出、アフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質精製、ホスト細胞質における組み換えタンパク質の増強された溶解性、良好なタンパク質、特に小ペプチドの発現、および/または発現された組換えタンパク質の培地、原核生物の細菌のペリプラズム、または酵母細胞のスフェロプラストへの分泌に有用である。組換え光センサーの発現は、ホスト細胞において構成的であってもよく、または選択したホストおよびベクターシステムに依存して例えば、硫酸銅、ガラクトースなどの糖、メタノール、メチルアミン、チアミン、テトラサイクリン、バキュロウイルスによる感染

10

20

30

40

50

、およびラクトースの安定な合成アナログであるIPTG（イソプロピル - D - ガラクトピラノシド）で誘発することができる。

【0215】

他の発現ベクターおよびホスト細胞の例は、BL21、BL21(DE3)、ならびにAD494(DE3)pLysS、Rosetta(DE3)、およびOrigami(DE3)(Novagen社)などの大腸菌ホスト細胞におけるタンパク質発現のための、pETベクター(Novagen社)、pGEXベクター(Amersham Pharmacia社)、およびpMALベクター(New England Labs社)である。例えばCHO、COS、HEK-293、Jurkat細胞およびMCF-7などの哺乳動物細胞株における発現のための、強力なCMVプロモーターに基づくpcDNA3.1(Invitrogen社)およびpCIneoベクター(Promega社)；アデノウイルス仲介遺伝子導入および哺乳動物細胞における発現のための、複製不能アデノウイルスベクターpAdenoX、pAd5F35、pLP-Adeno-X-CMV(Clontech社)、pAd/CMV/V5-DEST、PAD-DESTベクター(Invitrogen社)；レトロウイルス仲介遺伝子導入および哺乳動物細胞における発現のためのClontech社からのRetro-X(商標)システムでの使用のためのpLNCX2、pLXSN、およびpLAPSNレトロウイルスベクター；レンチウイルス仲介遺伝子移入および哺乳動物細胞における発現のためのpLenti4/V5-DEST(商標)、pLenti6/V5-DEST(商標)、およびpLenti6.2/V5-GW/lacZ(Invitrogen社)；アデノ随伴ウイルス仲介遺伝子導入および哺乳動物細胞における発現のための、pAAV-MCS、をpAAV-IRES-hrGFPおよびpAAV-RCベクター(Stratagene社)などのアデノ随伴ウイルス発現ベクター；Spodopera frugiperda 9(Sf9細胞)およびSf11昆虫細胞株における発現のためのBacPAK6バキュロウイルス(Clontech社)およびpFastBac(商標)HT(Invitrogen社)；ショウジョウバエSchneider S2細胞における発現のためのpMT/BiP/V5-His(Invitrogen社)；Pichia pastorisにおける発現のためのPichia発現ベクターpPICZa、pPICZ、pFLD(Invitrogen社)、ならびにP. methanolicaにおける発現のためのpMET およびpMET；酵母Saccharomyces cerevisiaeにおける発現のためのpYES2/GSおよびpYD1(Invitrogen社)ベクターである。Chlamydomonas reinhardtiiにおける異種タンパク質の大規模発現を使用してもよい。外来異種コード配列は、相同組換えによって、核、葉緑体およびミトコンドリアのゲノムに挿入される。スベクチノマイシンまたはストレプトマイシンに対する耐性を付与する多目的葉緑体選択マーカーであるアミノグリコシドアデニルトランスフェラーゼ(aadA)を担持する葉緑体発現ベクターP64は、葉緑体において外来タンパク質を発現させるために使用することができる。遺伝子銃法(biolistic gene gun method)は藻類にベクターを導入することができる。葉緑体への侵入には、外来DNAは遺伝子銃粒子から放出され、相同組換えを通じて葉緑体ゲノムに統合される。

【0216】

無細胞発現システムもまた、本発明のある態様における使用のために意図される。無細胞発現システムは、タンパク質のフォールディング、産物の毒性に対する感受性の減少、および、反応体積および処理時間の減少のため、迅速な発現スクリーニングなどのハイスループット戦略または大量のタンパク質産生に対する適合性に有利に働く反応条件の変更が容易であることを含む、従来の細胞に基づく発現方法を上回るいくつかの利点を提供する。無細胞発現システムは、プラスミドまたは直鎖DNAを使用することができる。また、翻訳効率の改善は、反応溶液のミリリットル当たりのタンパク質のミリグラムを超える収率をもたらした。一例として、高い収率でタンパク質を生じさせることが可能な無細胞翻訳システムを使用してもよい。当該方法は、反応溶液全体にわたってアミノ酸、アデニン三リン酸(ATP)、およびグアノシン三リン酸(GTP)を含む供給バッファーの連続流の設計、および翻訳されたポリペプチド産物の連続的な除去を使用する。当該システムは、無細胞連続供給バッファーを提供するために、大腸菌溶解物を使用する。この連続流システムは、原核および真核生物の両方の発現ベクターと互換性がある。一例として

、内在性膜タンパク質EmrE多剤トランスポーターの大規模無細胞産生であってもよい。他の市販の無細胞発現システム(Invitrogen)は、チューブ反応形式で活性を有する組換えタンパク質をミリグラム量まで生じさせる効率的かつ共役した転写および翻訳反応のための、大腸菌システムに基づくインビトロシステムを利用するExpressway(商標)Cell-Free Expression Systems;大腸菌に基づくインビトロシステムを使用するRapid Translation System(RTS)(Roche Applied Science);およびウサギ網状赤血球に基づくインビトロシステムを使用するTNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems(Promega)を含む。

【0217】

VI. 結論

本明細書に使用されるセクションの見出しは単に構成上の目的のためであり、いずれか方法において記載されても主題を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0218】

本教示は、様々な態様および例と併せて記載されたが、本教示はかかる態様または例に限定されるものではない。それどころか、本教示は、当業者によって理解されるように、様々な代替、修正、および等価物を包含する。

【0219】

様々な発明の態様が本明細書に記載および図示されたが、当業者は容易に、他の様々な手段および/または機能を行うための構造および/または結果の取得および/または本明細書に記載される1つまたは2つ以上の利点、および各々のかかる多様性および/または改変は、本明細書に記載される本発明の態様の範囲内であると考えられることを想定する。より一般には、当業者は、全てのパラメーター、寸法、材料、および本明細書に記載の構成は代表的であることを意味すること、実際のパラメーター、寸法、材料、および/または構成は、特定の用途または本発明の教示が使用される用途に依存するであろうことを理解するであろう。当業者は、本明細書に記載の本発明の特定の態様に対する多くの等価物を認識するか、または日常的な実験のみを使用して確認することができるだろう。したがって、前述の態様は例としてのみ提示されること、および添付の特許請求およびそれらの均等物の範囲内において、本発明の態様は、具体的に記載および請求した以外の方法で実施することができることは理解されるべきである。本開示の発明の態様は、各々の個々の特色、システム、物品、材料、キット、および/または本明細書に記載の方法に向けられる。さらに、2つまたは3つ以上のかかる特色、システム、物品、材料、キット、および/または方法のいずれか組み合わせは、かかる特色、システム、物品、材料、キット、および/または方法が相互に矛盾しない場合、本開示の発明の範囲内に含まれる。

【0220】

本発明の上述の態様は、いずれか多数の方法で実施することができる。例えば、いくつかの態様は、ハードウェア、ソフトウェア、またはそれらの組み合わせを使用して実施されてもよい。態様のいずれか側面がソフトウェアにおいて少なくとも部分的に実施される場合、当該ソフトウェアコードは、単一のコンピューターにおいて提供されようとなかろうと、または複数のコンピューター間で分散されようとなかろうと、いずれか好適なプロセッサまたはプロセッサの集合について実行することができる。

【0221】

この点において、例えば、測定された動画像の時間超解能のための方法を実行するための機械可読命令、顕微鏡システム200の自動または半自動制御のための機械可読命令など、本発明の様々な側面は、1つまたは2つ以上のコンピューターまたは他のプロセッサ上で実行される場合、上述の技術の様々な態様を実施する方法を行う、1つまたは2つ以上のプログラムでコードされたコンピューター可読記憶媒体(または複数のコンピューター可読記憶媒体)(例えば、コンピューターメモリー、1つまたは2つ以上のフロッピー(登録商標)ディスク、コンパクトディスク、光ディスク、磁気テープ、フラッシュメモリー、フィールドプログラマブルゲートアレイ(Field Programmable Gate Array)または他の半導体装置における回路構成、または他の有形なコンピューター記憶媒体あるい

10

20

30

40

50

は無形な記憶媒体)として、少なくとも部分的に実施することができる。当該コンピュータ可読媒体または媒体は可搬型であり、当該プログラムまたは記憶されたプログラムは、上述した本技術の様々な側面を行うための1つまたは2つ以上の種々のコンピュータまたは他のプロセッサ上にロードすることができる。

【0222】

当該用語「プログラム」または「ソフトウェア」は、上述した本技術の様々な態様を実施するためのコンピュータまたは他のプロセッサをプログラムするために用いることができる、いずれか型のコンピュータコードまたはコンピュータ実行可能命令の組を指すために、本明細書中に一般的な意味で使用される。さらに、本態様の一面より、実行された場合に本技術の方法を行う1つまたは2つ以上のコンピュータプログラムは、単一のコンピュータまたはプロセッサ上に常駐する必要はないが、本技術の様々な側面を実施するための数多くの種々のコンピュータまたはプロセッサ間で、モジュール方式で分散させることができることは理解されるべきである。

【0223】

コンピュータ実行可能命令は、1つまたは2つ以上のコンピュータまたは他のデバイスによって実行されるプログラムモジュールなどの多くの形態であってもよい。一般に、プログラムモジュールは、特定のタスクを実行するか、または特定の抽象データ型を実施するルーチン、プログラム、オブジェクト、コンポーネント、データ構造などを含む。通常、当該プログラムモジュールの機能は、様々な態様で望まれるように、組み合わせるか、または分散させることができる。

【0224】

また、本明細書に記載の当該技術は、少なくとも1つの例が提供された方法として実施することができる。当該方法の一部として行われる行為は、いずれか好適な方法で順序付けされてもよい。したがって、行為が図示とは異なる順序で行われ、同時にいくつかの行為を行うことを含むことができる態様は、代表的な態様において連続的な行為として示されとしても、構成することができる。

【0225】

すべての定義は、本明細書で定義および使用されるように、辞書の定義、参照により取り込まれる文献中の定義、および/または定義された用語の通常の意味を制御すると理解されるべきである。

【0226】

本明細書および特許請求の範囲において使用される不定冠詞「a」および「an」は、明確に反対に示されない限り、「少なくとも1つ」を意味すると理解されるべきである。

【0227】

本明細書および特許請求の範囲において使用される語句「および/または」は、結合された要素、すなわち、いくつかの場合において結合的に存在し、他の場合において別々に存在する要素の「いずれか一方または両方」を意味すると理解されるべきである。「および/または」で一覧として記載される複数の要素、すなわち、結合された要素の「1つまたは2つ以上」は、同じ方式で構築されるべきである。他の要素は、特異的に識別されたそれらの要素に関連しようとなかろうと、「および/または」節によって特異的に識別される要素以外で任意に存在することができる。したがって、非限定的な例として、「Aおよび/またはB」への参照は、「含む」などのオープンエンドの言語と併せて使用する場合、一態様において、Aのみ(B以外の要素を任意に含む)；別の態様において、Bのみ(A以外の要素を任意に含む)；さらに別の態様において、AとBの両方(他の要素を任意に含む)；などを指すことができる。

【0228】

本明細書および特許請求の範囲において使用される「または」は、上記に定義した「および/または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、一覧において項目を別々に分ける場合、「または」または「および/または」は包括的であり、つまり、要素の数または一覧の少なくとも1つ、しかし2つ以上も含み、追加の一覧に非記載の項目

も任意に含むと解釈されなければならない。「ただ1つの」または「正確に1つの」、または、特許請求の範囲において使用される場合、「からなる」など、反対に明らかに示された用語のみ、要素の数または一覧の正確に1つの要素の包含を指すだろう。一般に、「いずれか一方の」、「1つの」、「ただ1つの」、または「正確に1つの」などの排他性の用語が先行する場合、本明細書で使用される用語「または」は、排他的な代替（つまり、「一方または他方だが両方ではない」）を示すものとしてのみ解釈されるものとする。「から本質的になる」は、特許請求の範囲において使用される場合、特許法の分野で使用されるその通常の意味を有するものとする。

【0229】

本明細書および特許請求の範囲において使用されるように、1つまたは2つ以上の要素の一覧を参照して、語句「少なくとも1つ」は、要素の一覧における、いずれか1つまたは2つ以上の要素から選択される少なくとも1つの要素を意味すると理解されるべきであるが、要素の一覧内で具体的に一覧として記載される、各々および全ての要素の少なくとも1つを必ずしも含む必要はなく、要素の一覧における要素のいずれか組み合わせを除外しない。この定義はまた、要素が、特異的に識別されたそれらの要素に関連しようとなかろうと、語句「少なくとも1つ」が指す、要素の一覧内で特異的に識別された要素以外に任意に存在してもよいことも可能にする。したがって、非限定的な例として、「AおよびBの少なくとも1つ」（または、同等に、「AまたはBの少なくとも1つ」、または、同等に、「Aおよび/またはBの少なくとも1つ」）は、一態様において、少なくとも1つ、2つ以上を任意に含む、Bは存在しない（B以外の要素を任意に含む）A；別の態様において、少なくとも1つ、2つ以上を任意に含む、Aは存在しない（A以外の要素を任意に含む）B；さらに別の態様において、少なくとも1つ、2つ以上を任意に含む、Aであり、かつ、少なくとも1つ、2つ以上を任意に含む、B（他の要素を任意に含む）；などを指すことができる。

【0230】

特許請求の範囲ならびに上記明細書において、「含む」、「含有する」、「載せる」、「有する」、「包含する」、「関する」、「保持する」、「からなる」などの全ての移行句はオープンエンドである、つまり、これらを含むがこれらに限定されないことを意味すると理解されるべきである。移行句「からなる」および「から本質的になる」のみ、米国特許庁特許審査便覧の第2111.03項に述べられているように、夫々クローズまたはセミクローズの移行句であるものとする。

【0231】

その旨を明記しない限り、特許請求の範囲は、記載された順序または要素に限定されるものとして読まれるべきではない。形態および詳細における様々な変化が、添付の特許請求の精神および範囲から逸脱することなく、当業者によってなされてもよいと理解されるべきである。以下の特許請求の精神および範囲内に入る全ての態様およびそれらの等価物が記載される。

【0232】

例

理解のさらなる目的のために、予備実験試験の結果を以下に示す。これらの例は、本発明のある態様を図示することを意図するが、本発明の全範囲を図示するものではない。これらの例の詳細は、また、2011年11月27日にオンライン公開された“Optical recording of action potential in mammalian neurons using a microbial rhodopsin,” to J. M. Kralj et al., Nature Methodsにおいても見出すことができ、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。

【0233】

実験的試験において、哺乳動物の神経細胞の単一活動電位の信頼性の高い光検出を、約10倍改善した感受性および他のタンパク質に基づく電圧指標を上回る速度を有する、遺伝的にコードされた電圧指示タンパク質を使用して観察した。微生物ロドプシンタンパク質、アーキアロドプシン3（Arch）の内因性蛍光は、サブミリ秒の応答時間で、-1

10

20

30

40

50

50 mVと+150 mVの間のおよそ比例して2倍に増加した明るさを示した。その光誘発プロトンポンプ活性のために、Archは撮像レーザーで露光した膜の過分極を引き起こした。それにもかかわらず、単一の電氣的に始動された活動電位は、約10よりも大きい光シグナル対ノイズ比で蛍光のバーストを生んだ。変異ArchD95Nは、野生型より50%高い感受性を示し、内因性プロトンポンプを欠いたが、遅い応答を有した(41 ms)。Archは依然として個々の活動電位を分解することが可能であった。実験の観点において、微生物ロドプシンに基づく電圧指標は、複雑な神経回路、および、電極に基づく技術が挑戦的であるシステムにおける電気生理の光学調査を可能にしてもよい。

【0234】

本例は、緑色吸収プロテオロドプシン(GPR)に基づいた電圧指標を図示する。このプロテオロドプシン光プロトンセンサー(PROPS)は、大腸菌における電気スパイクを明らかにしたが、タンパク質が原形質膜に局在しなかったため、真核細胞においてPROPSを使用する努力は失敗した。PROPSに対する標的化配列および局在化配列の追加は助けにはならなかった。他の微生物ロドプシンを、真核生物の原形質膜に局在するタンパク質に着目し、推定上の電圧センサーとして試験した。Halorubrum sodomenseからのアーキアロドプシン3(Arch)は、光駆動の外側プロトンポンプであり、そのホストに対して太陽エネルギーを捕捉する。Archは、哺乳動物の神経細胞で発現されてもよく、神経活動の光サイレンシングを可能にし、暗所での内因性機能に対する動揺が最小限であることが示された。この例は、膜電位がタンパク質の光学特性を変化させることができ、それによってPROPSと同様なメカニズムを通じて機能した電圧センサーを提供するであろうことを示す。

【0235】

Archは、本例において細菌的に発現させた。中性pHで、細菌的に発現させたArchはピンクだったが、高pHでは、10.1のpKの推移で(方法1)タンパク質は黄色に変わった(図7A参照)。他の微生物ロドプシンとの相同性に基づき、pHによって誘発される色は、レチナール蛍光団を当該タンパク質コアに連結するシッフ塩基(SB)の脱プロトン化に対して変化すると考えられた。膜電位の変化は、SBでのプロトンの局所的な電気化学電位を変える可能性があり、酸-塩基平衡を傾け、同様な色のシフトを誘発すると考えられた(図7A)。電圧によって誘導される色のシフトのメカニズムは、以前バクテリオロドプシンの乾燥フィルムで報告され、PROPSでの電圧感受性の仮説の基礎を形成した。

【0236】

大半の微生物ロドプシンは、弱い蛍光性であるため、Archは期待される蛍光指標(表4)として特徴付けられる(方法1~3)。中性pHで、Archは近赤外蛍光(λ_{em} は約687 nm)を発し、一方、高pHでArchは蛍光性ではなかった(図7Bおよび図8A~8Cを参照)。Archの蛍光量子収率は低かったが(約 9×10^{-4})、光安定性は、GFPファミリーのメンバーに相当した。1:1のArch-eGFP融合体における、Arch(約640 nmで励起)の光退色速度のeGFP(約488 nmで励起)との比較は、光退色前に1分子当たり放出される光子の平均数は、比においておよそ1:3.9(Arch:eGFP)であることを示した。広範な吸収ピークは、約640 nmのArchの励起を可能にし、ある波長は、いくつかの他の細胞構成成分が吸収し、近赤外発光が、わずかなバックグラウンド自家蛍光のスペクトル領域において発生した。

【表 4】

表4

	$\lambda_{\text{max abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max em}}^{(1)}$ (nm)	$\epsilon_{633}^{(2)}$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	QY ⁽³⁾	eGFP に対する 光安定性 ⁽⁴⁾	SBの pK _a ⁽⁵⁾	$\tau_{\text{response}}^{(6)}$ (ms)	\hat{V}_{FL} における ノイズ ⁽⁷⁾ ($\mu\text{V}/\text{Hz}^{1/2}$)	光電流
Arch WT	558	687	6,300	9×10^{-4}	0.25	10.1	< 0.5	625	有
Arch D95N	585	687	37,500	4×10^{-4}	0.1	8.9	41	260	無

【0237】

表4は、ArchWTおよびD95Nの光学的および電気的応答を記載する。注釈は以下の通りである。(1) = 532 nmでの励起；(2) バクテリオロドプシン、 $63,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と同じピーク吸収係数を想定する校正された吸収スペクトル(方法2を参照)；(3) = 633 nmで励起されるAlexa647との比較によって決定された；(4) eGFPとの1:1の融合において測定された；(5) 吸収スペクトルの特異値分解によって決定された；(6) ステップ応答によって決定された(ArchD95Nは、その速い(約500 s未満)応答の微量構成成分(約20%)を有する)；(7)

10

【数2】

$$\hat{V}_{FL}$$

20

は蛍光から推定した膜電位である。ノイズはHEK細胞において0.1 Hz以上の周波数fで決定した。(これらの測定のさらなる詳細は方法の項に記載されている)。

【0238】

約5 μ 全トランスレチナルで補った(方法4を参照)HEK293細胞におけるArchの蛍光は、倒立蛍光顕微鏡において、赤色照明(が約640 nmであり、約20 mW、およびIが約540 W/cm²)、高開口数対物レンズ(NA)、Cy5フィルターセット、およびEMCCDカメラ(方法5、図3Aを参照)で容易に撮像できる。図3Aに描写する顕微鏡システム300を使用した試料のビデオ記録において観察され得るように、細胞は主に原形質膜に局在化した蛍光を示した。Archを発現しない細胞は蛍光性ではなかった。細胞は、継続的な10分間の露光にかけて約17%の光退色を示し、この間、正常な形態を保持した。

30

【0239】

Archを発現するHEK細胞の蛍光は、顕微鏡システムを使用して試料のビデオ記録においても観察され得るように、全細胞電圧クランプを介して決定されるように、膜電位に対して高度に敏感であることが見出された(方法6)。原形質膜におけるArchの蛍光は、約-150 mVと約+150 mVの間、この範囲全体にわたってほぼ線形応答で、約2倍に増加した(図7C)。膜電位のステップに対する蛍光の応答は、立ち上がりおよび立ち下りの端の両方における撮像システムの500 μ sの時間分解能内で発生した(図1d、方法7)。正弦波的に変化する膜電位の適用は、正弦波的に蛍光を変化させることにつながった；周波数fが約1 kHzで、蛍光振動は、それらの低周波振幅の約55%を保持した(方法8、図9を参照)。Archは、その内因性プロトンポンプ能力を保持し、かつ撮像レーザーでの照明は約10 pA~約20 pAの外向きの光電流を生成した。

40

【0240】

図9のデータについて、に示すように、約50 mVの振幅および約1 Hz~約1 kHzの周波数を有するチャープ(chirped)正弦波を細胞に適用した。膜電位

【数3】

$$\hat{V}_{FL}$$

は蛍光から決定され、

【数 4】

$$\hat{V}_{FL}$$

のフーリエ変換を算出した。約 1 kHz での上昇は、電子補償回路の人為産物である。挿入図：一定の $V = 0 \text{ mV}$ での電圧クランプ下の

【数 5】

$$\hat{V}_{FL}$$

におけるノイズのパワースペクトルは、約 $470 \mu\text{V} / (\text{Hz})^{1/2}$ のショットノイズ制限ノイズフロア (shot-noise limited noise floor) を、約 10 Hz を上回る周波数で示す。ここで報告されたノイズの図は、我々の撮像システムに特定のものであり、Archの可能性のある感受性の指標として主に働く。

【0241】

線形回帰アルゴリズムは、強度が外部「トレーニング」刺激と同時変化した画素を識別するために開発された（方法 9）。重み付けされていない全視野蛍光でトレーニングすると、このアルゴリズムは、細胞膜に関連する画素を識別し（図 7 E）、明るい電圧非感受性の細胞内凝集体に対応する画素を拒絶した。画素重み行列の値の生の蛍光に対する適用は、重み付けされていない全視野蛍光に対して改善されたシグナル対ノイズ比（SNR）で蛍光の電圧によって誘発される変化の推定を導いた。この画素重み付けアルゴリズムの使用は、電気生理学的データを利用しなかった。

【0242】

発現レベルの細胞間の多様性のため、蛍光データ単独では、真の膜電位を決定するには不十分であり、膜局在化は蛍光と電圧の間の先験的な未知のオフセットおよびスケールファクターにつながった。電気生理学的データ上でトレーニングすると、アルゴリズムは、膜電位の最尤推定値に蛍光画像を変換するために使用することができるであろう画素重み係数を返した（方法 7）。約 -150 mV ~ 約 $+150 \text{ mV}$ の電圧掃引上でのトレーニングの後、蛍光に基づく

【数 6】

$$\hat{V}_{FL}$$

は電氣的に記録された V_m に約 $625 \mu\text{V} / (\text{Hz})^{1/2}$ の正確性で匹敵した（図 10 を参照）。約 10 s よりも長い時間スケールにわたって、レーザパワーの変動および細胞の動きは、電圧決定のサブ mV の精度を低下させたが、 V_m において高速過渡を検出する能力に影響を与えなかった。

【0243】

Arch は、培養ラット海馬神経細胞における電圧指標としてウイルス送達を使用して試験した（方法 10 ~ 11）。Arch を発現する神経細胞は、膜局在化した蛍光を示した（図 11 A）。全細胞電流クランプの下では、細胞は約 200 pA の電流パルスを入力するとスパイクを示した。個々のスパイクは、全視野蛍光の明確に識別できる増加を伴った（図 11 B）。強度が全視野蛍光と共に変化する、優先的に重み付けされた画素は、SNR で約 74 % 改善につながった（図 11 C）。このトレーニング手順は、電氣的記録を利用しなかった。電氣的記録上で画素重み付けアルゴリズムをトレーニングすることは、SNR でさらに 5 % の増加につながった。（図 11 D）。

【0244】

AP ダイナミクスのビデオを生じさせるために、AP のダイナミクスは、図 3 A に描写するように、顕微鏡システムを使用して細胞内の分解能で撮像した（図 12 を参照）。シグナル対ノイズ比を改善するために、単一スパイクの複数の映像を登録し、時間的に平均した（図 11 E を参照）。AP は、定められた視野（ $100 \mu\text{m}$ ）および露光時間（ 2 ms ）で、期待通り、細胞の大半の領域全体にわたってほぼ同時に発生したように見えた。しかし、局所化された領域において AP は $2 \sim 3 \text{ ms}$ 遅れた。この遅れは、記録したビデ

オにおいて特に明らかである。今回の結果は、A r c h が、電圧感受性色素での最近の実証と同様な様式で、遺伝的に特定された神経細胞における A P の細胞内ダイナミクスをマッピングするために使用できることを示唆する。

【0245】

図 1 1 F は単一試行の光学的および電氣的記録のギャラリーを示す。2 k H z のフレーム速度で、蛍光のシグナル対ノイズ比（スパイク振幅：ベースラインノイズ）は約 1 0 . 5 であった。スパイク発見アルゴリズムはスパイクの 9 9 . 6 % を 0 . 7 % の偽陽性率（N = 2 6 9 スパイク）（方法 1 2 ）で正しく判別した（同時に記録された膜電位との比較に基づいて）。蛍光によって決定された平均の A P 波形は、電氣的に記録された波形と一致した。単一細胞は、静止電位またはスパイク周波数における検出可能な変化なしで、最大 4 分の累積露光で観察された。

10

【0246】

手順は、神経細胞の過増殖した視野において、電氣的に単一細胞にタグ付けするために開発された。A r c h を発現する全ての細胞の集団の平均蛍光は、はっきりと分解された細胞構造を示さなかった（図 1 1 G）。全細胞パッチは単一細胞上に形成され、その後、ビデオ観察の下で、振幅が 1 5 0 m V の電圧クランプ三角波に供した。どの画素が印加電圧に関する情報を含んだか示す重み行列は、標的細胞の鮮明な画像およびそのプロセスの全てを生んだ。電氣的なタグ付けは、単一の神経細胞を標識するために現在使用される遺伝的および化学的な方法を補完する。

20

【0247】

追加されたレチナールが存在しない場合、A r c h を表現する神経細胞は、個々のスパイクを伴う明確に識別可能な蛍光点滅を示し（図 1 3 A）、神経細胞がいくつかのタンパク質を集合させるために十分な内因性のレチナールを含んでいたことを示す。図 1 3 A において、A r c h W T を発現する 1 4 D I V 神経細胞からの A P の単一試行記録は、外因性レチナールなしに、電気（青）および蛍光（赤）トレースを示す。A P は明確に分解される。補足レチナールの添加は、3 0 分にわたる約 3 0 ~ 6 0 % の蛍光の増加につながった（図 1 3 B）。図 1 3 B は、1 0 μ レチナールの添加後の時間の関数としての単一神経細胞の蛍光を示す。レチナールの取り込みの影響での電圧ダイナミクスの混交を回避するために、神経細胞を実験前に、C C C P で処理することにより脱分極した。A r c h および他の微生物ロドプシンを用いたインビボの実験は、内因性レチナールが神経活動の光遺伝的制御に十分であることを示した。したがって A r c h は、外因性レチナールなしにインビボの電圧指標として機能することができる。

30

【0248】

6 4 0 n m の照明は、A r c h の吸収スペクトル（ $\lambda = 5 5 8$ n m）のピークから遠かったが、撮像レーザーは、それにもかかわらず、A r c h を発現する H E K 細胞において約 1 0 ~ 2 0 p A の光電流を誘発した（図 1 4 A）。膜電位を乱さないが、電圧感受性を維持する変異体が求められた。バクテリオロドプシンにおける変異 D 8 5 N は、プロトンポンプを除外し、相同変異 D 9 5 N は A r c h に導入した。この変異は光電流を除外し（図 1 4 A）、電圧感知にとって重要ないくつかの他の光物理的特性をシフトした（表 4、図 1 4 A ~ 1 4 D、図 1 5）。膜電位の変化に対する蛍光応答の映像を図 3 A に描写する顕微鏡システムを使用して記録した。A r c h D 9 5 N は A r c h W T よりも高感度であったが、遅い応答を有した（図 1 4 B ~ 1 4 D）。

40

【0249】

神経活動を撮像するために一般的に使用される照明条件の下で（全反射（T I R）モードで $I = 1 8 0 0$ W / c m ²）、光によって誘発される外向きの光電流は、A r c h W T を発現する神経細胞において典型的には約 1 0 p A であった。電流クランプ条件下では、この光電流は最大 - 2 0 m V で、神経細胞の静止電圧をシフトさせた。活性化閾値付近の神経細胞について、この光電流は発火を抑制し得るであろうから（図 1 6 A）、その非ポンプ変異体 D 9 5 N は、神経細胞における電圧指標として探索された。A r c h D 9 5 N の照明は神経細胞における膜電位を乱さなかった（図 1 6 B）。

50

【0250】

ArchD95Nは単一試行的に神経細胞のAPを報告した(図16C)。脱分極電流パルスに対する応答はステップ応答の遅い構成成分によって優位に占められた;しかし応答の速い構成成分はAPを示すために十分であった。

【0251】

図17は、感受性および応答速度にしたがってプロットされた他の蛍光電圧指標に対するArchWTとD95Nの比較を示す。既存の指標の位置はおおよそのものであり、文献データから得られる。最も感受性が高い蛍光タンパク質VSFP2.xファミリーは、およそ100msの応答時間で、100mVの電圧当たり約10%の蛍光の変化を有する。電圧センサーのSPARCファミリーは、1msの応答時間を有し、100mV当たり1%未満の蛍光変化を示す。微生物ロドプシンに基づく指標は他のプローブよりもはるかに感受性が高い。最も感受性が高い微生物ロドプシンに基づく指標は、プロテオロドプシン光学プロトンセンサー(PROPS)であるが、PROPSは原核生物においてのみ機能する。蛍光電圧感受性色素(VSD)もまた図17に示される。これらの化合物のいくつかは、Archのそれを上回るシグナル対ノイズで脳切片における活動電位の光学的記録を可能にした。表5は図17に基づくデータを含む。表5は蛍光電圧指示タンパク質のおおよその特性を示す。いくつかの場合において、番号は公開されたプロットから推定した。当該表は蛍光指標の全ファミリーの代表的なメンバーを含むが、多くが省略されている。

【表5】

表5

分子	100mV当りの おおよその $\Delta F/F$	おおよその応答時間	備考
VSFP2.3 ¹	9.5%	78 ms	レシオメトリック ($\Delta R/R$)
VSFP2.4 ¹	8.9%	72 ms	レシオメトリック ($\Delta R/R$)
VSFP3.1 ²	3%	1-20 ms	タンパク質
Mermaid ³	9.2%	76	レシオメトリック ($\Delta R/R$)
SPARC ⁴	0.5%	0.8 ms	タンパク質
FlaSh ⁵	5.1%	2.8-85 ms	タンパク質
Flare ⁶	0.5%	10-100 ms	タンパク質
PROPS ⁷	150%	5 ms	タンパク質
di-4-ANEPPS ⁸	8%	<1 ms	色素
di-8-ANEPPS ⁹	10%	<1 ms	色素
RH237 ¹⁰	11%	<1 ms	色素
RH421 ¹¹	21%	<1 ms	色素
ANNINE-6plus ¹²	30%	<1 ms	色素
hVOS ¹³	34%	<1 ms	ハイブリッド
DiO/DPA ¹⁴	56%	<1 ms	ハイブリッド

【0252】

Archはおおよそ5,000の既知の微生物ロドプシンの1つである。このタンパク質のファミリーは、色の調整が可能であり、光安定的で、かつ環境に対する感受性が高い、GFPに対する相同性を有さない蛍光団で生体膜を標識することが可能な能力について検討することができる。野生型および変異微生物ロドプシンのスクリーニングは、ArchWTのように高速だがArchD95Nのようにポンプを欠く変異体を識別するために使用することができる。輝度を高める努力、または他の非蛍光撮像モダリティーを見出す努力もまた意図される。Archから2光子蛍光を観察するための初期の努力は成功しなかった;しかし、Archの励起は大半の2光子蛍光団に対して赤にシフトするため、スペクトル的に調整された2光子励起での追加の研究が認められる。他の蛍光タンパク質とのArchの融合は、レシオメトリック電圧測定、ならびに電圧およびpHまたはCa²⁺

の同時測定を可能にしてもよい。それらは発現レベルにおける変化または運動の人為産物に対してはるかに非感受性であるため、レシオメトリック測定は有用である可能性がある。光遺伝的な電圧制御の最近確立された技術での光遺伝的な電圧測定の組み合わせは、全ての光電気生理に向けた進展を可能にすることができる。

【0253】

別の例において、「Optopatch」と呼ばれる遺伝子コンストラクトは、同時光刺激および神経細胞からの記録を提供するために使用される。Optopatchコンストラクトの一態様は、チャンネルロドプシン64 (ChR64) - mOrange II およびアーキアロドプシン3 (Arch) - eGFPの共発現のための2シストロン性のベクターからなる。このコンストラクトは図18Aに描写される。当該図において使用される略語は以下のように解釈することができる。ss：原形質膜へのArchの輸送を改善するように設計されたシグナル配列；Arch：アーキアロドプシン3；eGFP：増強された緑色蛍光タンパク質；ER2：原形質膜へのArchの輸送を改善するように設計された小胞体輸送モチーフ；P2A：単一のmRNAの転写物から2つのタンパク質の発現をもたらすリボソームスキップサイトである、テッショウウイルス-1 P2A配列；ChR64：青色光活性化イオンチャンネルであるチャンネルロドプシン64；mOr2：mOrange 2 蛍光タンパク質。

10

【0254】

図18Bの描写に図示されるように、当該コンストラクトは、1：1の化学量論比において、単一のmRNA転写産物からの2つのタンパク質を生じさせるリボソームスキップ配列 (P2A リンカーペプチド) を含んだ。このコンストラクトは、発現レベル、膜輸送、化学量論的な共発現、ならびにアクチュエーターおよびレポーターのスペクトル的な分離性について最適化された。ChR64は、より一般に使用されるチャンネルロドプシン2と比較して、青にシフトした作用スペクトル、高発現、および大きい光電流を有した。Archは赤にシフトした有利な照明波長 (640 nm)、高い感受性、および高速を有した。

20

【0255】

当該optopatchコンストラクトは、培養マウス海馬神経細胞におけるCamKII α またはhSynapsin1プロモーターの制御下で発現させた。標準的な広視野撮像条件下 (230 W/cm²、640 nm) での赤色光の照射は、 34 ± 7 pA (N = 6細胞) のArchによって仲介される外向きの光電流につながった。この電流は細胞を 6.1 ± 1.1 mV (N = 8細胞) によって過分極させた。この過分極にもかかわらず、Optopatchを発現する神経細胞は、培養液中のシナプス伝達によって駆動される可能性が高い自発的な活動を示す、赤色蛍光の自発的な発火を示した。薄暗い青色光 (15 mW/cm²、488 nm) を有する照明は、 216 ± 114 pA (n = 7細胞) のChR64によって仲介される内向きの光電流につながった。したがって、過分極させるArch光電流は、脱分極させるChR64光電流に容易に圧倒された。

30

【0256】

青色光のパルスでの全視野照明 (20 mW/cm²、10 ms、488 nm、10 Hzで繰り返し) は、高速EMCCDカメラ上で検出された赤色蛍光 (em: 660 ~ 760 nm) の点滅につながった。同時パッチクランプ記録は、各点滅が単一の活動電位に対応することを示した。光学的に記録された蛍光波形は、(図18Cに示す) 単一試行的に電氣的に記録された波形、1 kHzの取得速度で1.1 mVの光学的に記録された電圧におけるノイズと密接に一致した。

40

【0257】

デジタルマイクロミラー装置 (DMD; 608 x 684 画素、4000 フレーム/秒) は空間かつ時間分解された様式でOptopatchコンストラクトを刺激するための488 nm励起経路に取り込まれた。DMDの配置を図19Aに示す。当該構成は、青色光 (488 nm) での空間的にパターン化された照明、および赤色光 (640 nm) での蛍光の撮像を同時に可能とする。青色レーザーからの光は、デジタルマイクロミラー装置 (

50

DMD)に反射する。DMDの各画素は、個別にアドレス指定可能であり、顕微鏡またはビームダンプに光を向けることができる。ダイクロイックミラーは、赤色(640nm)レーザーからのビームと、DMDからのパターン化された照明を組み合わせる。リレーレンズは、対物レンズの後焦点面上に両ビームを集束させる。赤色光で広視野照明を提供する一方、対物レンズは、試料上にDMDの画像を投影する。(図2Aに示さない)リレー光学系は、試料上にDMDの縮小された画像を投影した。DMDの各画素は、試料面で0.65μmに対応した。カスタムソフトウェアはDMD座標をEMCCDカメラ座標にマッピングし、ユーザーが選択した試料のいずれか領域の正確な光学的な標的化を可能にした。

【0258】

典型的な実験において、ユーザーは、広視野照明を使用して、1つまたは2つ以上の神経細胞の画像を取得した。ユーザーは、刺激するために、1つまたは2つ以上の領域を選択し、かつ刺激の時間的なプロファイルを特定した。励起機器は、青色照明のパターンで刺激を送達した。EMCCDカメラは、画素数と速度の間の所望のトレードオフに依存して、Archの続く近赤外蛍光を500~2000フレーム/秒で記録した。実験試行は、5~10Hzの光刺激での30~50秒の継続的な記録からなった。かかるいくつかの試行は活動電位波形の明らかな変化なしに典型的に実施され、1,000~2,000の活動電位のデータ組につなげることができるだろう。

【0259】

図19Bは、典型的なOptopatch実験からの結果を示す。神経細胞の細胞体は、青色光(150mW/cm²、10ms)で標的化された。これは活動電位応答を誘発した。1つの励起事象について、全体の神経細胞(細胞体およびプロセス)は、2~3ms続いた蛍光のスパイクを示し、単一の活動電位応答を示した。刺激は100msの間隔で400回繰り返された。図19Bは、397回繰り返された刺激全体にわたって平均した蛍光応答を示す。図中の画像。図19Bは、平均Arch蛍光(グレー)、Arch蛍光(F/Fヒートマップ)および光刺激(青)の変化を示す合成である。

【0260】

Optopatch技術は、前述の時間超分解能技術と組み合わせられた。Optopatchコンストラクトを発現する神経細胞の細胞体は光刺激で標的化され、一連の活動電位を生成した。Archの蛍光は約1ms/フレームでEMCCDカメラ上に記録されたこれらの活動電位を報告した。図20Aは、カメラが1ms/フレームの最大フレーム速度で操作されたにも関わらず、活動電位の伝播が明らかに生画像において分解されなかったことを示す。図20Bは、100μs毎に算出された活動電位の一連の超分解能画像を示す。当該伝播は生データにおいて明らかではなかったが、超分解能の手順は、APが刺激の点で発信し、ほぼ一定の速度で外側に伝播したことを明確に示した。

【0261】

方法

以下は上記の例において有用な様々な方法である。

【0262】

(1)タンパク質コンストラクトおよび膜分画。全ての実験はArch-eGFP融合体で行った。Arch-eGFP(FCK:Arch-eGFP)をコードするレンチウイルスのバックボーンプラスミドは、Edward Boyden博士(MIT)からの寛大な贈り物である。当該遺伝子は、制限部位EcoRIおよびNcoIを使用してpet28bベクターにクローニングした。D95N変異は、フォワードプライマー(5'-TTATGCCAGGTACGCCAAGCTGGCTGTTTACCAAC;配列番号48)およびリバースプライマー(5'-GTGGGTAAACAGCCAGTTTGGCGTACCTGGCAATAA;配列番号49)を使用してQuikChangeII kit(Agilent)を使用して作成した。

【0263】

ArchおよびそのD95N変異体は大腸菌で発現させた。簡潔には、大腸菌(BL21株、pet28bプラスミド)は、37℃で0.4のOD600まで、100マイクロ

10

20

30

40

50

グラム / mL のカナマイシンを有する 1 L の LB において増殖させた。全てのトランスレチナール (5 マイクロモル) およびインデューサー (0.5 mM の IPTG) を添加し、暗闇の中でさらに 3.5 時間、細胞を増殖させた。細胞を遠心分離によって回収し、pH 7.3 の 50 mM の Tris、2 mM の MgCl₂ 中に再懸濁し、チップソニケーターを使用して 5 分間溶解させた。溶解物を遠心分離し、ペレットを 1.5 % のドデシルマルトシド (DM) を補足した PBS 中に再懸濁した。混合物をガラス / テフロン (登録商標) ボッターエルページェムホモジナイザー (glass/Teflon Potter Elvehjem homogenizer) でホモジナイズし、再び遠心分離した。上清中の可溶化タンパク質を実験に使用した。

【0264】

(2) ArchWT および D95N の分光学的特徴付け。ArchWT および D95N を含有する分画された大腸菌の膜の吸収スペクトルは、DT-MINI-2-GS 光源を有する Ocean Optics USB4000 分光計を使用して測定した (図 8)。微生物ロドプシンのピーク吸収係数は、ロドプシン型によって 48,000 ~ 63,000 M⁻¹ cm⁻¹ まで異なる。Arch とバクテリオロドプシン (BR) の間の高い相同性のため、BR の吸収係数、63,000 M⁻¹ cm⁻¹、を Arch に使用した。ArchWT (558 nm) および D95N (585 nm) の異なる最大吸収波長は、表 1 に示すように、633 nm で著しく異なる吸収係数をもたらした。ArchWT について、633 nm は当該吸収の裾に存在したが、ArchD95N については、633 nm は肩下の途中に位置した。ArchWT および D95N の 633 nm での相対吸収係数は、ピーク吸収係数の参照として BR を使用する選択に依存しない。ArchWT および D95N の吸収スペクトルは pH 6 と 11 の間の pH の関数として測定された。

【0265】

ArchWT および D95N の蛍光発光スペクトルは、100 mW、532 nm レーザー (Dragon Lasers、532GLM100) または 25 mW、633 nm の HeNe レーザー (Spectra-Physics) の照明を使用して決定した (図 8)。散乱レーザー光は、532 nm の Raman notch filter (Omega Optical、XR03) または 710/100 emission filter (Chroma) で遮断し、蛍光は、Ocean Optics QE65000 spectrometer へ光を通す 1000 ミクロンファイバーでの照明に対して垂直に集光した。スペクトルは 2 秒間積算された。ArchWT および D95N の両方が 687 nm で発光極大を有した。

【0266】

ArchWT および D95N の蛍光量子収率は、積算された発光強度を Alexa 647 色素の試料の発光に対して比較することによって決定した。簡潔には、色素およびタンパク質のマイクロモル溶液の濃度は可視吸収スペクトルを使用して決定された。これらの微生物ロドプシンがバクテリオロドプシンと同じ吸収係数を有すると仮定し、Alexa 647 の 270,000 M⁻¹ cm⁻¹ ならびに ArchWT および D95N の 63,000 M⁻¹ cm⁻¹ の吸収係数を使用した。Arch に相当する蛍光発光を有する溶液を得るために、当該色素溶液は次に 1:1000 に希釈された。色素およびタンパク質試料の蛍光発光スペクトル試料は 633 nm の励起で測定した。次に量子収率を以下の式によって決定した。

【数 7】

$$QY_{Arch} = \frac{Fl_{Arch}}{Fl_{Alexa}} * \frac{\epsilon_{Alexa}}{\epsilon_{Arch}} * \frac{c_{Alexa}}{c_{Arch}} * QY_{Alexa}$$

ここで、Fl は 660 ~ 760 nm の積算蛍光であり、イプシロン () は 633 nm での吸収係数であり、c は濃度である。

【0267】

(3) Arch および eGFP の相対光安定性。Arch および eGFP の光安定性の直接比較を行うために、Arch-eGFP 融合体の光退色を検討した。この戦略では、

2つの蛍光団の1:1の化学量論比を保証し、分析を単純化させた。実験は透過性細胞上で顕微鏡において行い、細胞の光退色をビデオ記録した。Archの光退色の映像は当初640nmの照明の下で記録し;次に、同じ視野上で488nmの照明下でeGFPの光退色を、同じArchに関しておよそ初期の計数率が得られるように調整された照射強度で記録した。蛍光バックグラウンドレベルは、各映像のタンパク質を含まない領域付近から得られ、タンパク質を含む領域の強度から差し引かれた。各光退色のタイムトレース下の面積を算出し、各蛍光団から検出された光子の総数の推定値を得た。eGFPの発光($\lambda_{max} = 509\text{ nm}$)およびArch発光($\lambda_{max} = 687\text{ nm}$)は異なる発光フィルターを通して集光したため、フィルターの透過スペクトルおよびEMCCDカメラの波長依存的な量子収率について生カウントを修正した。その結果、光退色の前に放出された光子の相対数はeGFP:ArchWTについて3.9:1であり、eGFP:ArchD95Nについてこの比は10:1であった。

10

【0268】

(4) HEK細胞培養。37℃、5%CO₂で、10%FBSおよびペニシリン-ストレプトマイシンを補足したDMEMにおいてHEK-293細胞を増殖させた。プラスミドは、LipofectamineおよびPLUS reagent (Invitrogen) を使用して、メーカーの指示にしたがってトランスフェクションし、48~72時間後の間でアッセイした。記録の前日に、細胞を約5000細胞/cm²の密度でガラスボトムディッシュ(MatTek)上に再播種した。

20

【0269】

HEK細胞における内因性のレチナールの濃度は知られていなかったため、細胞を、5マイクロモルの最終濃度まで増殖培地中においてストックのレチナール溶液(40mM DMSO)で希釈することによって、レチナールを補足し、次に細胞をインキュベーターに1~3時間戻した。全ての撮像および電気生理は、タイロッドバッファー(以下をmMで含む:125 NaCl、2 KCl、3 CaCl₂、1 MgCl₂、10 HEPES、30 グルコース、pH 7.3、およびスクロースで305~310mOsmに調整)中で行った。-10と-40mVの間で逆転電位を有するHEK細胞のみを分析に含めた。

【0270】

(5) 顕微鏡。同時蛍光および全細胞パッチクランプ記録は、室温で操作された自家製の倒立落射蛍光顕微鏡上で取得した。詳細な仕様は、図3Aに示される。1つの目標は、蛍光を高効率に集光させること、また神経細胞全体およびそのプロセスを撮像するための十分に大きな視野を達成することであった。典型的には、顕微鏡対物は、倍率と集光能力(開口数)の間のトレードオフを提供する。さらに、単一細胞にパッチを維持しながら、倍率を変化させる能力は、いくつかの場合に重要であった。典型的には、切換え対物 特に水または油浸対物 に関連する振動は同時パッチクランプと互換性がない。さらに、いくつかの場合において、2つの波長帯域に視野を分割する能力および画像の両半分の位置合わせを変更することなく倍率を変更する能力は重要であった。

30

【0271】

これらの目標を同時に達成するために、顕微鏡は、照明領域および倍率を変えるための可変ズームカメラのレンズを有する60x NA 1.45油浸対物レンズ(Olympus 1-U2B616 60X Oil NA 1.45)を中心に設計された。倍率は10xと66xの間で対物に触れることなく継続的に変化可能であった。当該顕微鏡は、わずかな再配置で容易に単一バンドおよび二重バンド撮像の間で変換した。

40

【0272】

Arch蛍光を観察するためにレーザー照明およびEMCCD検出が必要であることが見出された。レーザーおよびEMCCDカメラを後付けした直立電気生理学装置上において、液浸対物(Olympus LUMPlanFI - 40x W/IR; NA 0.8)はHEK細胞の電圧依存的な蛍光を記録するために十分な光を集めた。しかし、高いシグナル対ノイズ比でのAPの記録は高いNAの対物(例えばOlympus 1-U2B893 60x Water NA 1.2;または1-U2B616 60x Oi

50

1 NA 1.45)を必要とした。

【0273】

(6)電気生理。フィラメントガラスマイクロピペット(WPI)は火災研磨した3~10メガオームの先端抵抗まで引き伸ばされ、内部液(以下をmMで含む:125グルコン酸カリウム、8 NaCl、0.6 MgCl₂、0.1 CaCl₂、1 EGTA、10 HEPES、4 Mg-ATP、0.4 Na-GTP、pH7.3:スクロースで295 mOsmに調整)で満たされた。マイクロピペットはBurleigh PCS 5000 micromanipulatorで置いた。全細胞、電圧クランプ記録は、AxoPatch 200B amplifier(Molecular Devices)を使用して取得し、内部Bessel filterで、2 kHzでフィルタリングし、National Instruments PCIe-6323 acquisition boardで10 kHzでデジタル化された。周囲60 HzのノイズはHumBug Noise Eliminator(AutoMate Scientific)を使用して除去された。膜電位の迅速な調節を必要とする実験のために、直列抵抗および全細胞の静電容量は95%と予測され、約50%に補正された。電気刺激はPCI-E-6323 acquisition boardを使用して生成され、AxoPatchに送られ、次に定電流または定電圧モードのいずれかでこれらのシグナルを印加した。

10

【0274】

光電流の測定は、1800 W/cm²の強度で640 nmの照明の短いパルス(200 ms)に露光しながら0 mVで電圧クランプに保持されたHEK細胞上で行った。

【0275】

全ての実験は室温で行われた。

20

【0276】

(7)ランプならびにArchWTおよびD95Nのステップ応答。膜電位の関数として蛍光を測定するために、三角波は、-150 mV~+150 mVの振幅および12 s周期、フレーム当たり100 msでのビデオ録画で適用された。画素重み行列は、式S2(下)に従って算出され、各フレームにつき蛍光番号を生成するために、映像画像に適用された。これらの蛍光値は $V = -150 \text{ mV}$ でそれらの最小値によって除した。結果は、図11および14中のVの関数としてプロットされている。この手順は、細胞膜における画素からのデータを優先的に重み付けしたが、いずれかバックグラウンドの減算を伴わなかった。同等の結果は、手動で原形質膜の領域に対応する画素を選択すること、および、バックグラウンドの減算なしにVの関数としてそれらの強度をプロットすることによって得られた。生蛍光からのバックグラウンドの減算を行えば、 $\Delta F/F$ のかなり大きな値が得られたであろう。

30

【0277】

ステップ応答は、テスト波形が300 msの持続時間および1秒周期で、-70 mV~+30 mVの一連の電圧パルスからなることを除き、同様の様式で測定された。細胞は、20回の繰り返し波形に供し、蛍光応答は全ての反復にわたって平均された。

【0278】

(8)ArchWTおよびD95Nの周波数依存的応答関数。テスト波形は、連結された一連の正弦波、各々2秒の持続時間、100 mVの振幅、ゼロ平均、および1 Hzと1 kHzの間の対数スケール上で一様に等間隔の周波数(合計31周波数)からなった。当該波形は10 kHzで離散化され、かつ細胞に印加される一方、2 kHzのフレーム速度で蛍光映像が取得された。

40

【0279】

【数8】

$$\hat{V}_{FL}(t)$$

を抽出するためのモデルパラメーターは、低周波電圧に対する蛍光応答から算出した。これらのパラメーターは次に推定電圧を全ての周波数で算出するために使用された。

【0280】

印加電圧は、瞬間的な応答を有する電圧指標の応答を模倣するために2 kHzまでダウ

50

ンサンプリングされた。各印加周波数について、

【数 9】

$$\hat{V}_{FL}(t)$$

のフーリエ変換を算出し、ダウンサンプリングした $V(t)$ のフーリエ変換で除した。この比の振幅は応答感受性を決定した。正確な応答スペクトルを得るために、先端抵抗および細胞膜の静電容量を適切に補償することは、いくつかの場合において重要であった。膜に結合した G F P を発現する細胞の対照実験は、ほとんどまたは全く電圧依存的な蛍光を示さなかった。

【0281】

一定の $V = 0$ の下での

【数 10】

$$\hat{V}_{FL}(t)$$

のパワースペクトルもまた、いずれか印加された $V(t)$ シグナル対ノイズ比の計算を可能にするために測定された。

【0282】

(9) 蛍光画像からの膜電位の推定。蛍光電圧指標を特徴付ける一般的な方法は、100 mV の膜電位当たりの $\Delta F/F$ の値を報告することである。しかし、これはここでは使用されなかった。いくつかの場合において $\Delta F/F$ の値は、特にいくつかの電圧で F がゼロに接近する指標について、バックグラウンド減算方法に感受性が高い。第二に、 $\Delta F/F$ は、絶対的な蛍光レベル、バックグラウンド、および当該指標の膜標的化に依存するシグナル対ノイズ比について、ほとんどまたは全く情報を含まない。第三に、 $\Delta F/F$ の比は、蛍光の時間的な安定性についての情報をほとんどまたは全く含まない。変動は、細胞内輸送、光退色、または他の光物理のために発生することもある。

【0283】

これらの例では、一連の蛍光画像から膜電位を推測するアルゴリズムを含む、蛍光シグナルの情報内容を報告した電圧指標の性能の尺度が使用された。推定膜電位が真の膜電位に相当した正確性は、(パッチクランプ記録によって報告されるように) 指示薬の性能の尺度として使用された。

【0284】

推定された膜電位、

【数 11】

$$\hat{V}_{FL}(t)$$

は、2つのステップで蛍光から決定された。第一に、モデルはトレーニングされ、各画素で蛍光に対して膜電位を関連づけた。蛍光シグナル $S_i(t)$ が、画素 i および時間 t で、以下によって与えられる非常に単純化されたモデル：

【数 12】

$$S_i(t) = a_i + b_i V(t) + \varepsilon_i(t), [S1]$$

ここで、 a_i および b_i は位置依存的であるが、時間非依存的な定数であり、膜電位 $V(t)$ は時間依存的であるが位置には非依存的であり、かつ $\varepsilon_i(t)$ (イプシロン) は、空間および時間に無相関な、画素依存的な分散を有するガウス型白色ノイズである：

10

20

30

40

【数 1 3】

$$\langle \varepsilon_i(t_1) \varepsilon_j(t_2) \rangle = \sigma_i^2 \delta_{ij} \delta(t_1 - t_2),$$

該式は時間を通じての平均を示す。

【0 2 8 5】

このモデルは、電圧に対する蛍光応答における非線形性、電圧の変化に対するタンパク質の有限の応答時間、光退色、細胞運動またはステージドリフト、および、 $S_i(t)$ がショットノイズによって占められる場合、その分散は $S_i(t)$ に比例すべきであり、その分布はガウスではなくポアソンであるはずであるという事実を無視する。これらの単純化にもかかわらず、式 S 1 のモデルは、それが適用された同じデータセットから校正された場合に膜電位の良好な推定値を提供した。

【0 2 8 6】

式 1 における式の画素特定なパラメーターは、以下のように示すように、最小二乗法によって決定される。平均蛍光および平均電圧からの偏差は以下によって定義された：

【数 1 4】

$$\delta V(t) = V(t) - \langle V(t) \rangle.$$

次にスロープ \hat{b}_i の推定値は：

$$\hat{b}_i = \frac{\langle \delta S_i \delta V \rangle}{\langle \delta V^2 \rangle}, \text{ であり、オフセットは：}$$

$$\hat{a}_i = \langle S_i \rangle - \hat{b}_i \langle V \rangle.$$

電圧の画素毎の推定値は次式から形成される：

$$\hat{V}_i(t) = \frac{S_i(t)}{\hat{b}_i} - \frac{\hat{a}_i}{\hat{b}_i}.$$

この推定値の正確性は次式によって測定される

$$\varepsilon_i^2 = \langle (\hat{V}_i(t) - V(t))^2 \rangle.$$

【数 1 5】

最大尤度重み行列は次式によって定義される：

$$w_i \equiv \frac{1/\varepsilon_i^2}{\sum_t 1/\varepsilon_i^2}. \quad [\text{S2}]$$

この重み行列は、蛍光が当該トレーニングセットにおける電圧の正確な推定量である画素を好む。

【 0 2 8 7 】

膜電位を推定するために、画素毎の推定は、次式にしたがって組み合わせられる：

【 数 1 6 】

$$\hat{V}_{FL}(t) = \sum_i w_i \hat{V}_i(t) \quad [S3]$$

10

式 S 1 の基礎となる近似値内において、式 S 3 は $V(t)$ の最尤推定値である。

【 0 2 8 8 】

膜電位が知られていない場合、画像内に变化する膜電位を有する単一の細胞のみが存在することを条件として、全体画像 $I(t)$ の合計強度によって $V(t)$ を置き換えることができる。この場合、当該アルゴリズムは、強度が平均強度と共に变化する画素を優先的に重み付けする。かかる画素は膜に関連する。この修正された手順によって、当該膜における基礎となる強度変化の推定値が得られる。出力は、未知のオフセットおよびスケールファクターとは別に、真の膜電位に近似する。この修正された手順の重要な特色は、それがパッチピベットなしにスパイクの識別を可能にすることである。

【 0 2 8 9 】

20

取られた 30,000 フレームのビデオ記録（例えば、1,000 フレーム / s で 30 s のデータ）上で、アルゴリズムのトレーニング段階は、デスクトップ PC 上で実行するためにおよそ 3 分を要した。受信ビデオデータに対する重み付け係数の適用は、ほぼリアルタイムで行うことができるだろう。

【 0 2 9 0 】

(10) 分子生物学およびウイルス生産。Arch-EGFP (FCK: Arch-EGFP) をコードするプラスミドは、HEK 細胞における実験にいずれも直接的に使用され、または公開された方法に従って VSV 偽型ウイルスを生じさせるために最初に使用された。シュードタイピングのために、HEK 293 細胞を、Lipofectamine および PLUS reagent (Invitrogen) を使用して、pDeltag.74、VSVg、および Arch 30
バックボーンプラスミドのいずれかと共にトランスフェクションした。ウイルス上清を 48 時間後に回収し、0.45 マイクロメートルの膜を使用して濾過した。ウイルス媒体は、さらに濃縮させることなく、神経細胞に感染させるために使用した。

【 0 2 9 1 】

D95N 変異は、大腸菌プラスミドと同じプライマーを使用して、メーカーの指示に従って QuickChange kit (Stratagene) を使用して導入された。

【 0 2 9 2 】

(11) 神経細胞培養液。E18 ラット海馬を BrainBits から購入し、1 mg / mL パイロリジン (Worthington) の存在下で機械的に解離させた後、ポリ-L-リシンおよびマトリゲルでコートされた (BD Biosciences) ガラスボトムディッシュ上にディッシュ当たり 5,000 ~ 30,000 の細胞を播種した。この密度ではシナプス入力発火は自発的な発火を生成しなかった。細胞を N^+ 培地 (100 mL の Neurobasal 培地、2 mL の B27 サプリメント、0.5 mM グルタミン、25 マイクロモルのグルタミン酸、ペニシリン-ストレプトマイシン) 中において 3 時間インキュベートした。追加の 300 マイクロリットルのウイルス培地を細胞に添加、一晩インキュベートし、 N^+ 培地を 2 mL の最終体積とした。2 日後、細胞に 1.5 mL の N^+ 培地を与えた。細胞にグルタミン酸なしの 1 mL の N^+ 培地を 4 DIV で与え、かつ 3 ~ 4 日毎に 1 mL を与えた。10 ~ 14 DIV まで成長することが可能であった。細胞は 5 マイクロモルの最終濃度まで増殖培地中においてストックレチナル溶液 (40 mM、DMSO) で希釈することにより、細胞にレチナルを補足し、次にインキュベーターに細胞を 1 ~ 3 時間戻し、その後実験に使用した。 40
50

【 0 2 9 3 】

全細胞電流クランプ記録は、H E K細胞の記録に使用した同じ条件下で、成熟した神経細胞から得られた。直列抵抗およびピペットの静電容量を補正した。 - 5 0 と - 7 0 m V の間の静止電位を有する神経細胞のみを分析に使用した。

【 0 2 9 4 】

(1 2) スパイクソーティング。電氣的に記録された $V(t)$ または光学的に決定された【数 1 7】

$$\hat{V}_{FL}(t)$$

のいずれかに適用することができるであろうスパイク識別アルゴリズムを開発した。入力トレースは参照スパイクによって畳み込まれた。ユーザー定義の閾値を超えた畳み込まれた波形のセクションは、推定スパイクとして識別された。1 0 m s 以内に入る複数のスパイク（閾値に近いノイズ誘発異常の結果）は、クラスター化され、1として識別された。

【図1A - 1C】

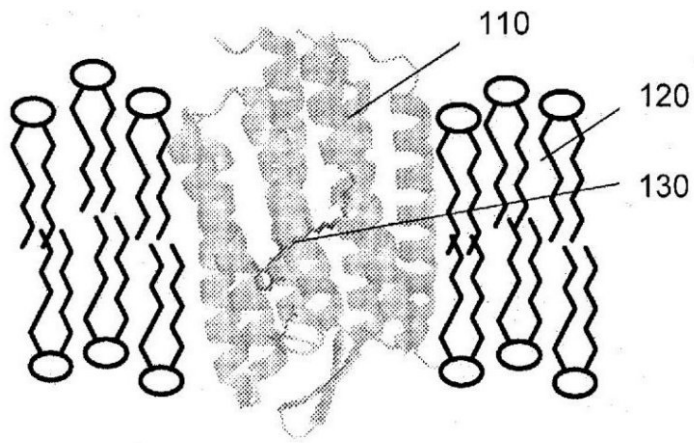


図1A

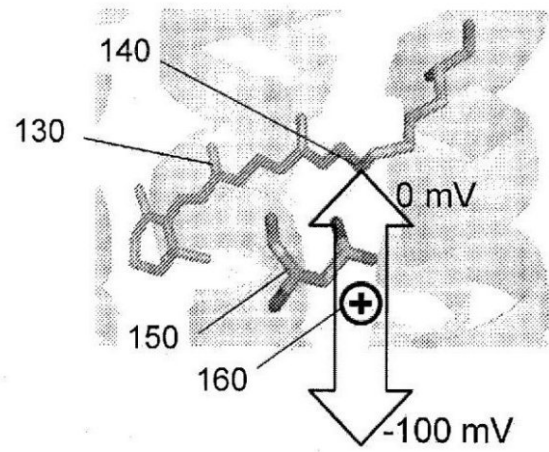


図1B

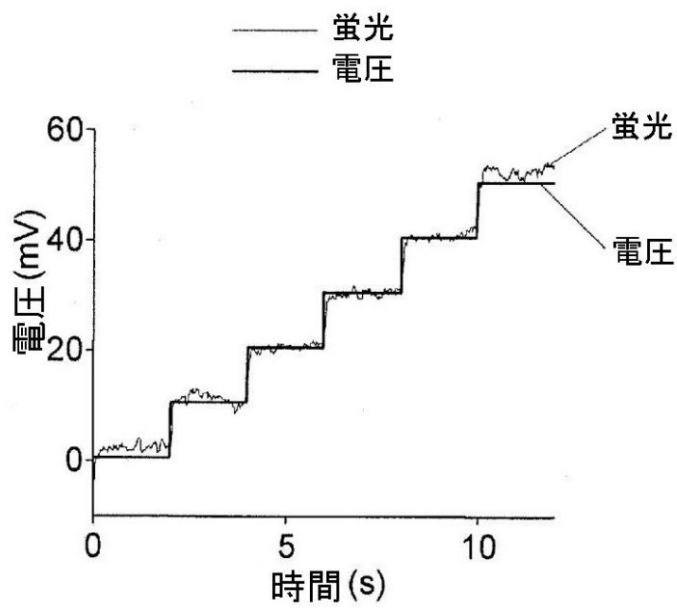


図1C

【図 2】

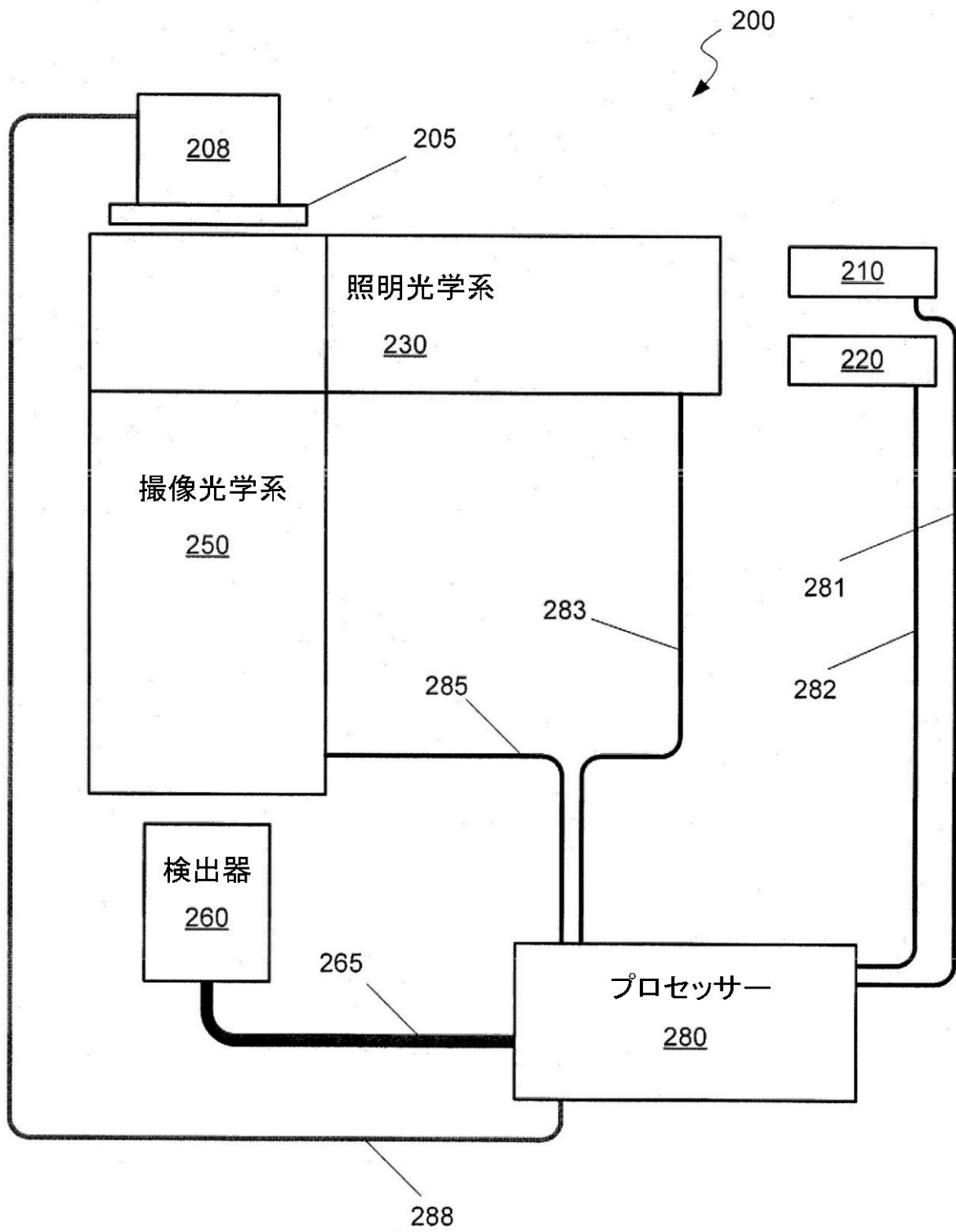


図2

【図 3 A】

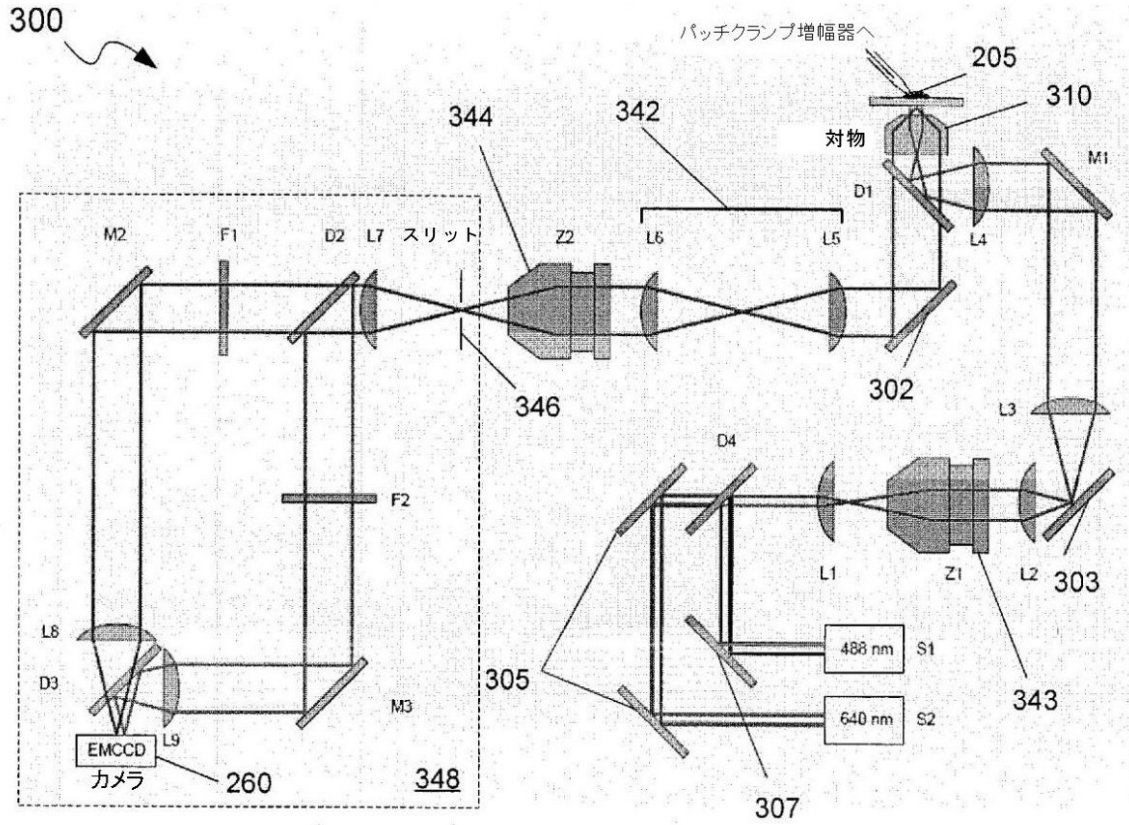


図3A

【図 3 B】

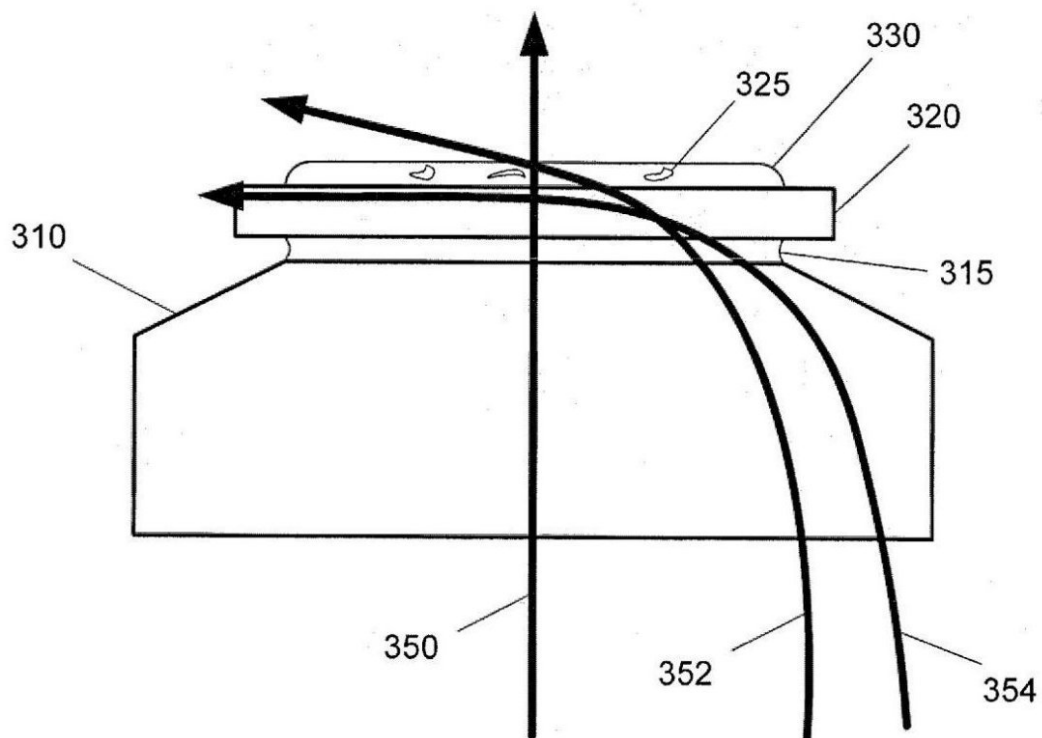


図3B

【図 4 A - 4 D】

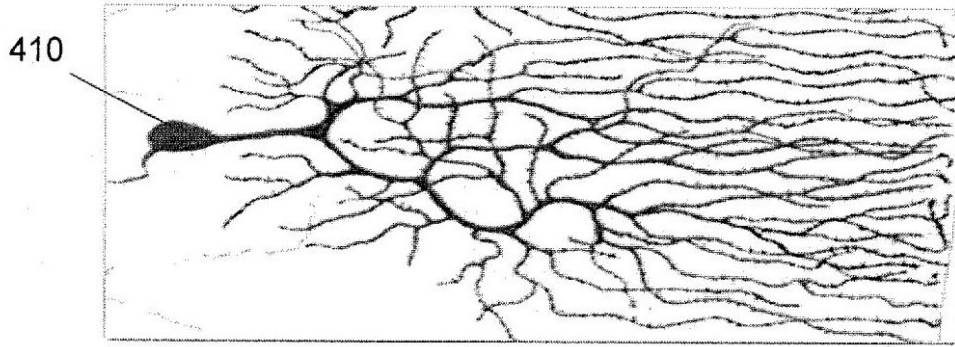


図4A

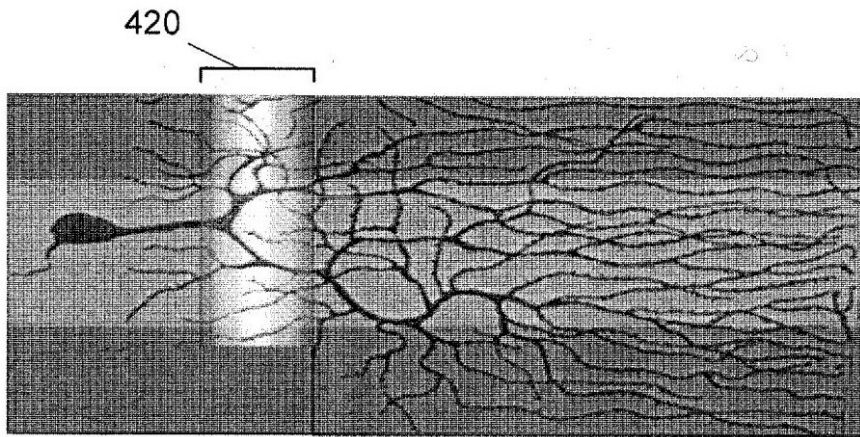


図4B

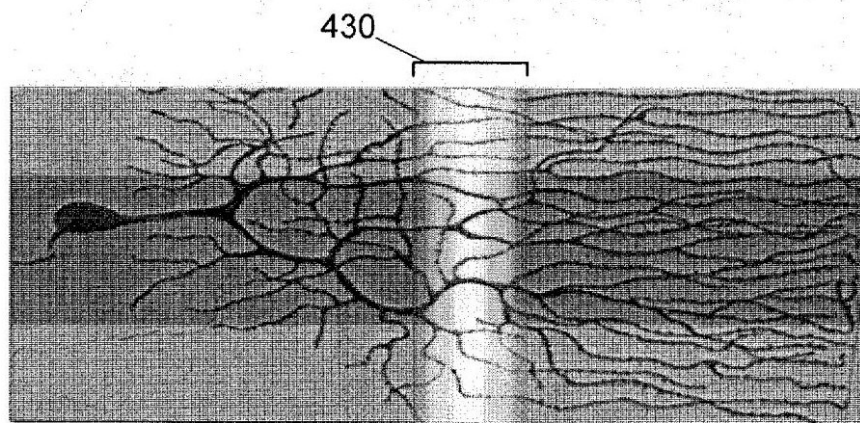


図4C

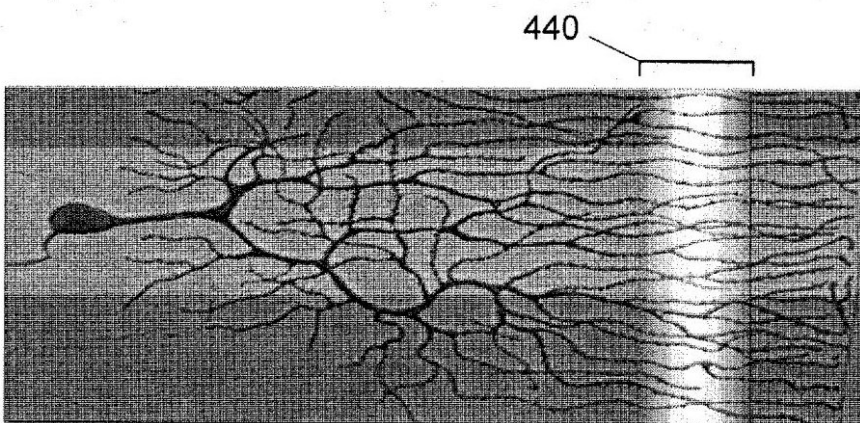


図4D

【図5A】

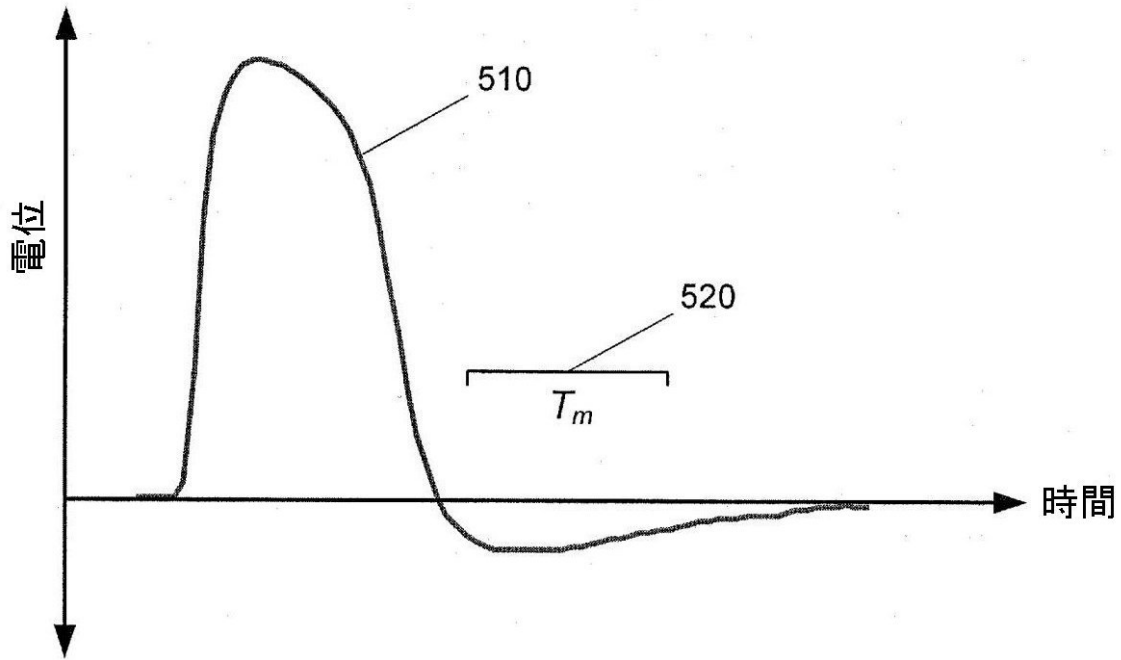


図5A

【図5B】

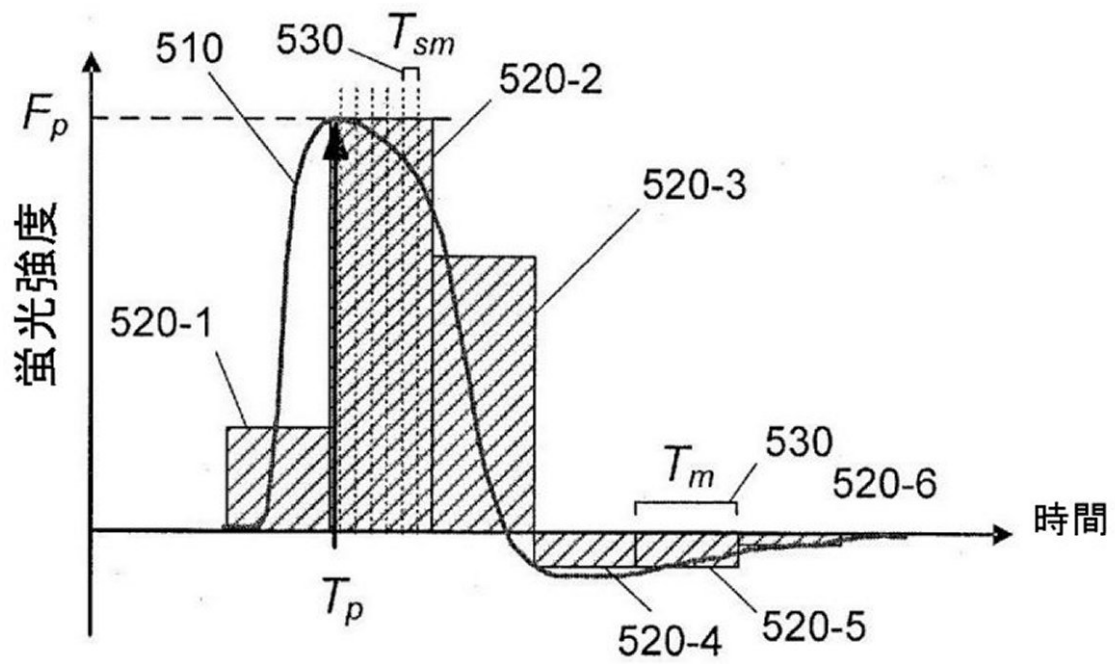


図5B

【図 5 C】

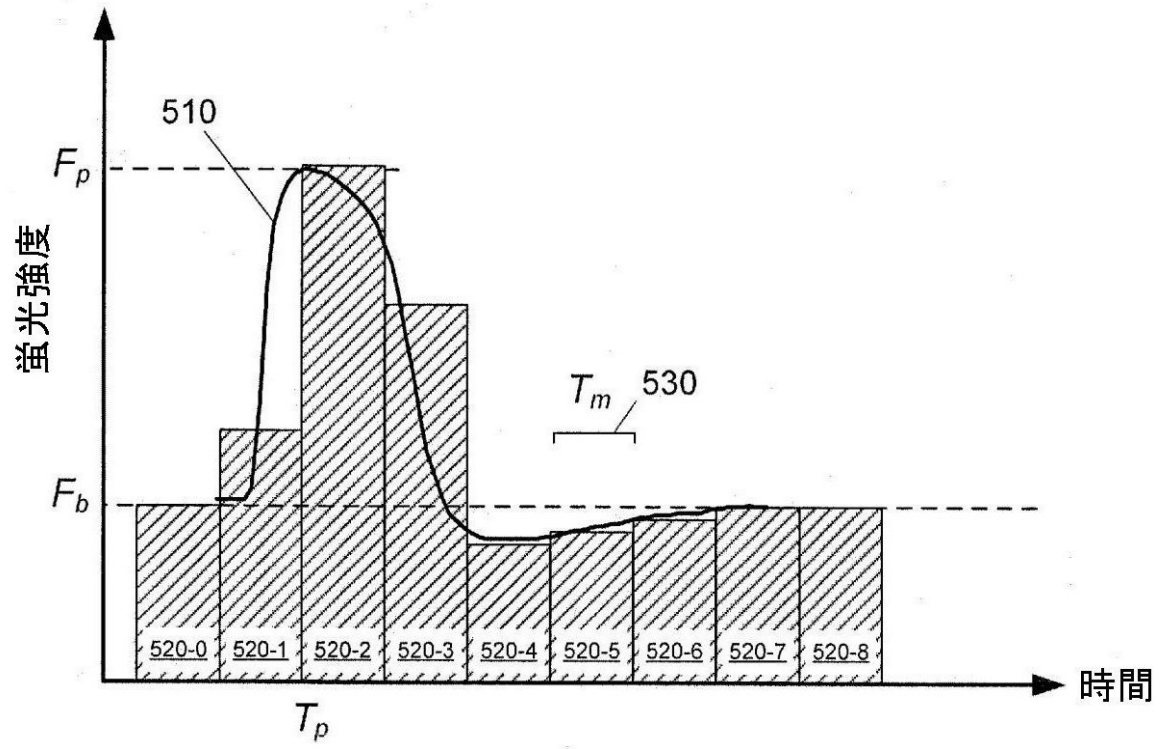


図5C

【図 5 D】

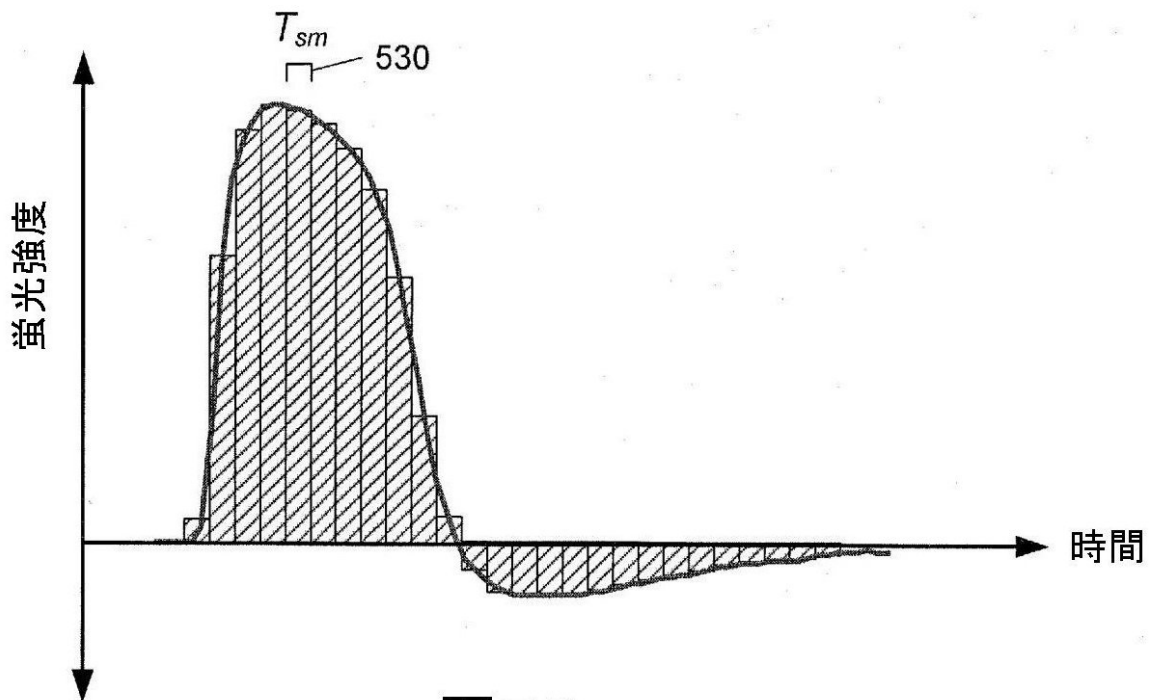


図5D

【図 5 E - 5 F】

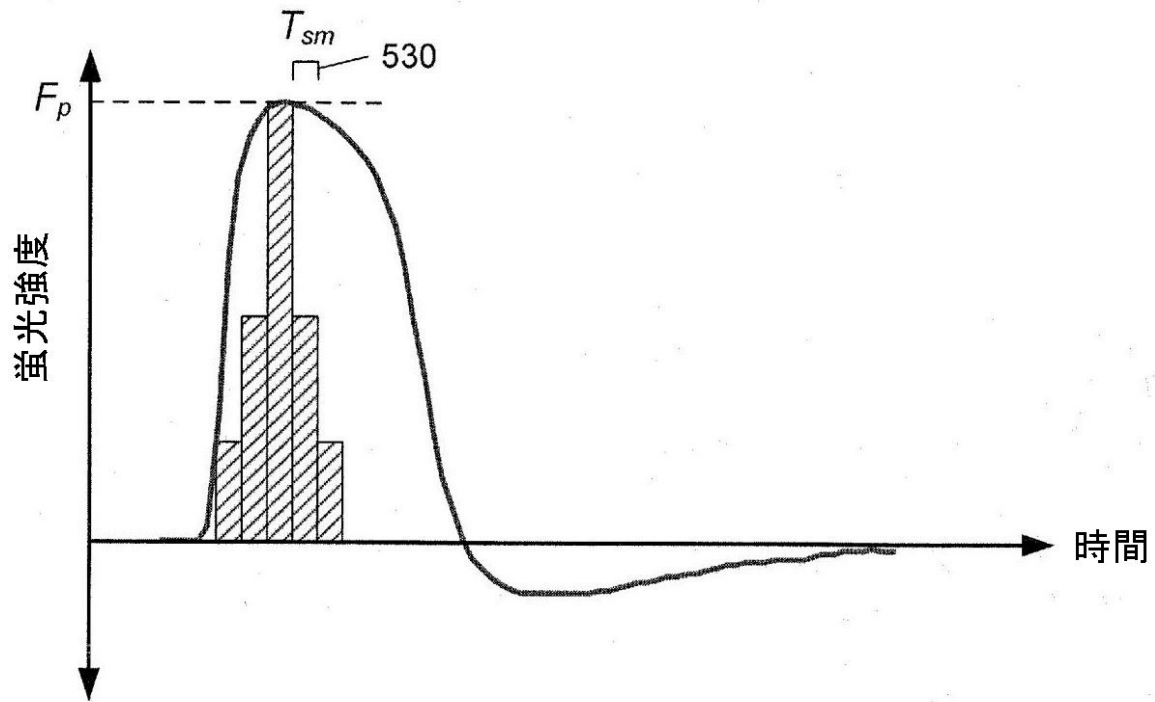


図5E

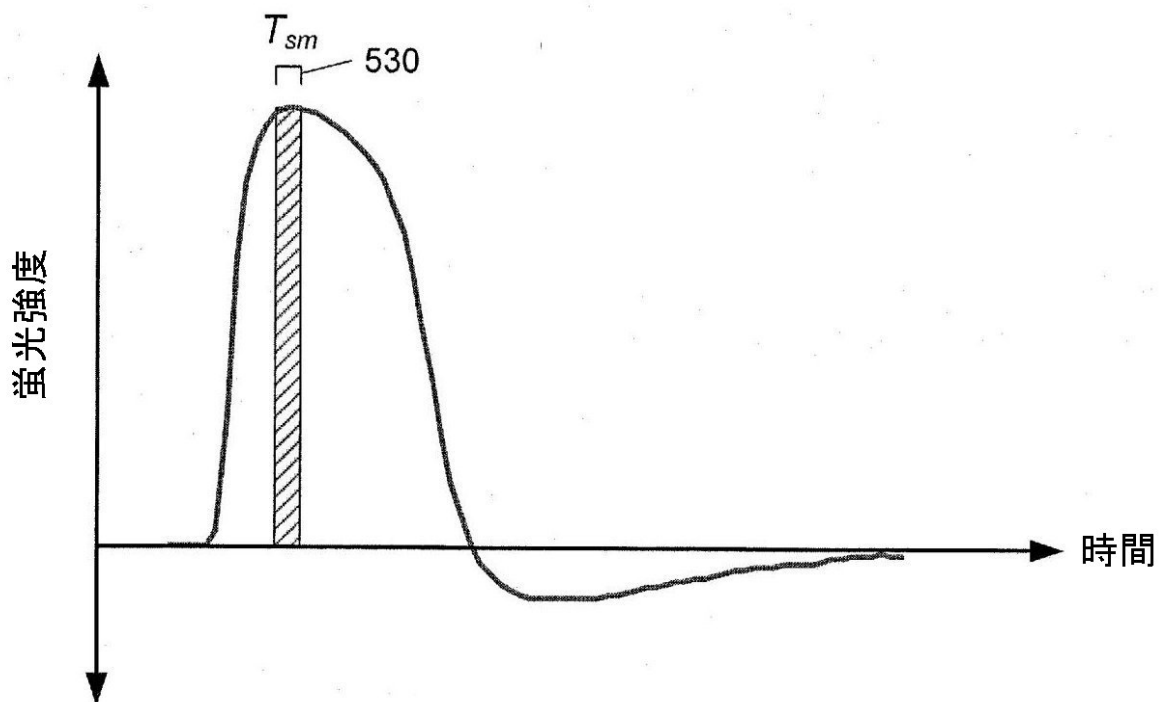


図5F

【図 6】

600

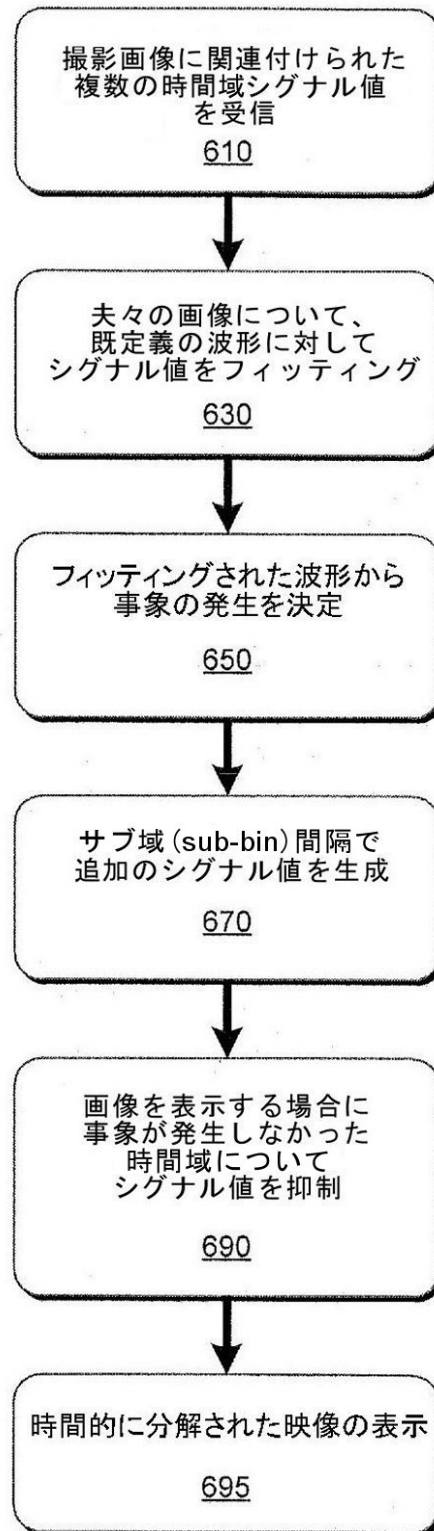


図6

【図 7 A】

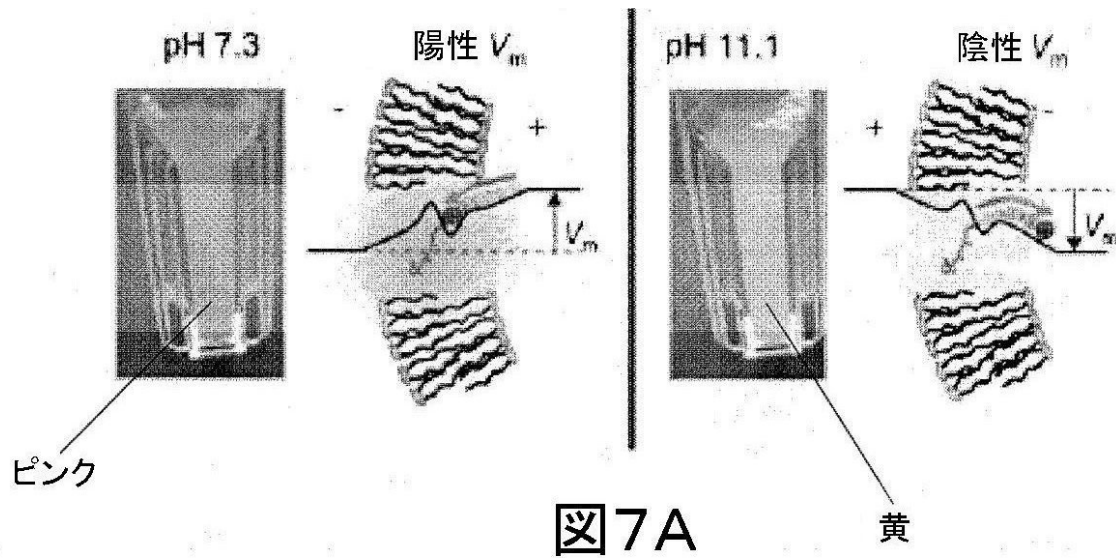


図7A

【図 7 B】

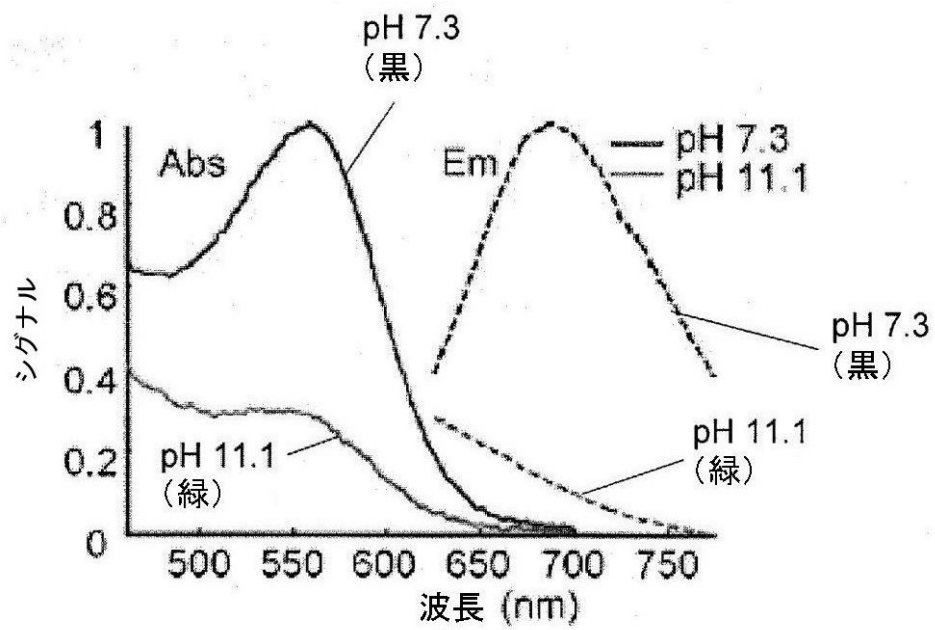


図7B

【図7C - 7E】

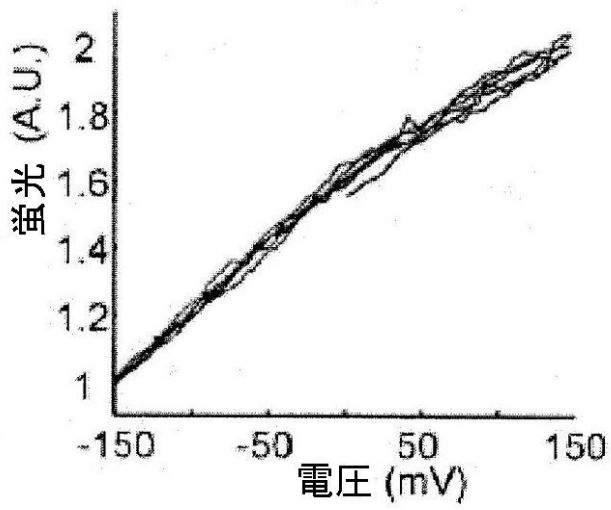


図7C

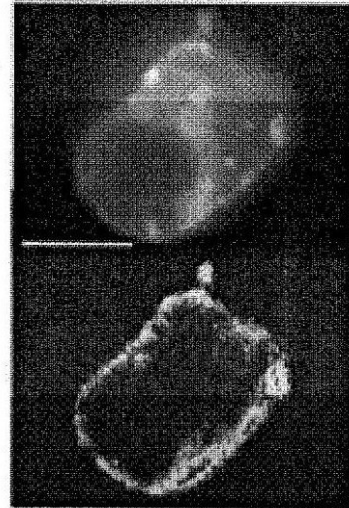


図7E

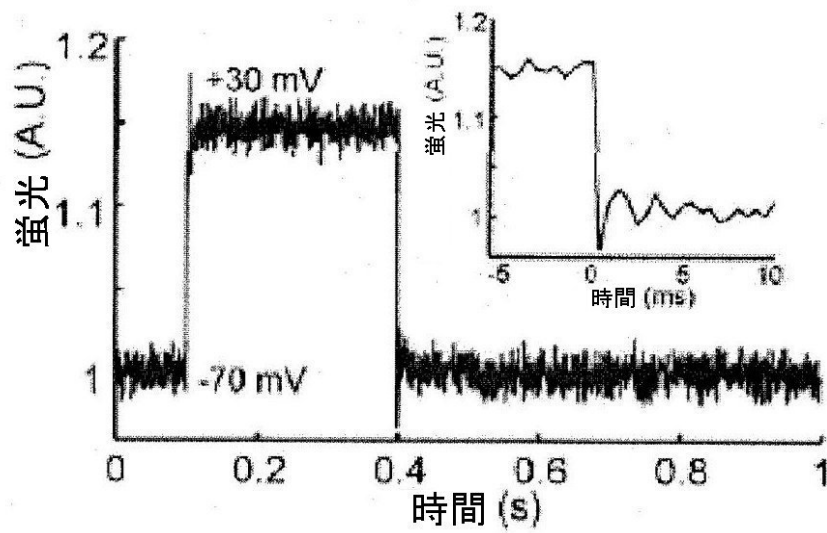


図7D

【図8A - 8C】

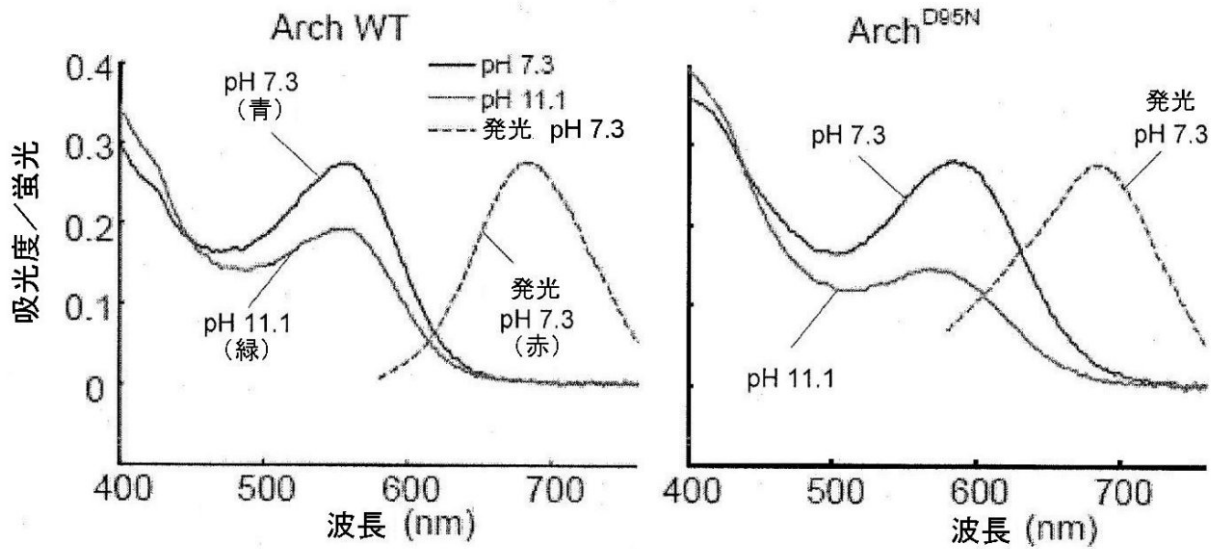


図8A

図8B

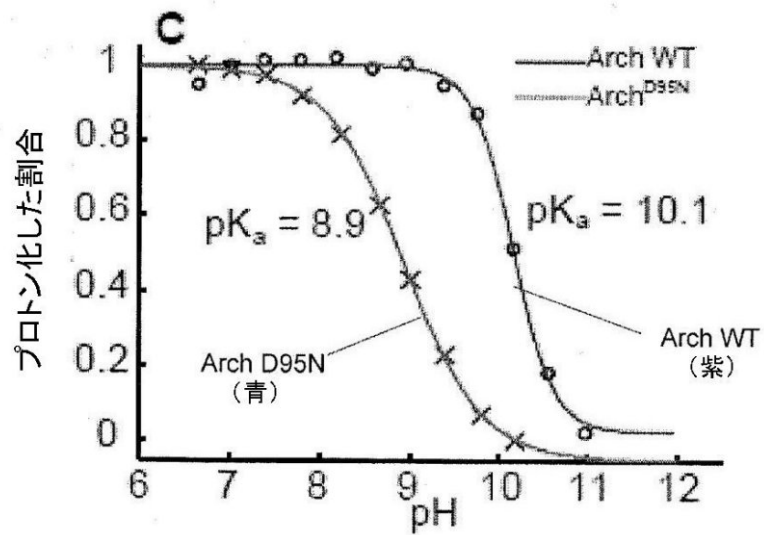


図8C

【図9】

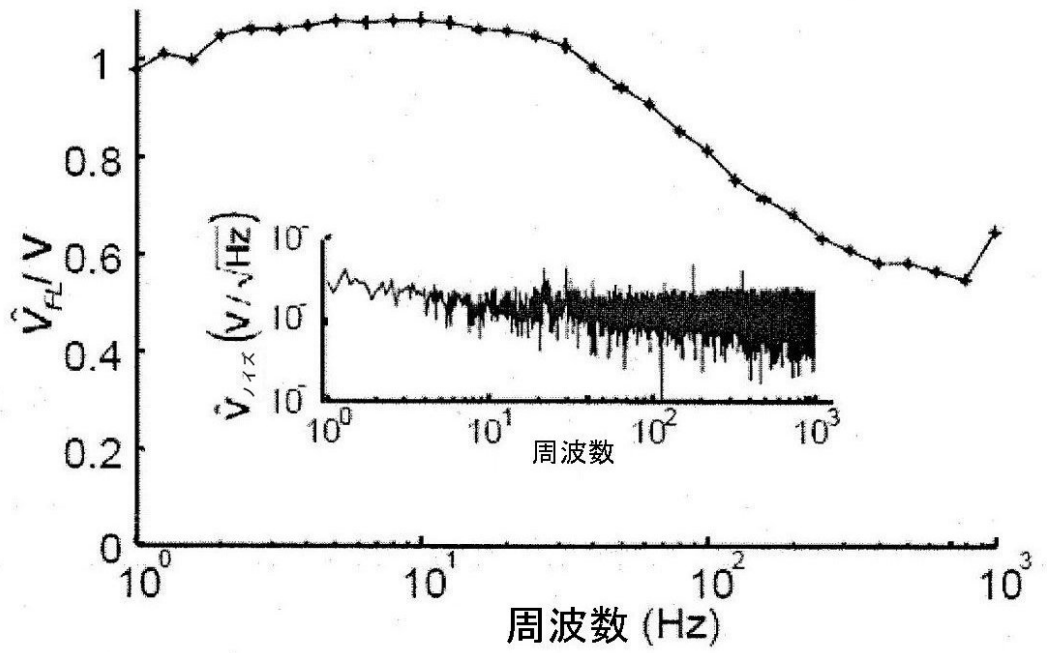


図9

【図10】

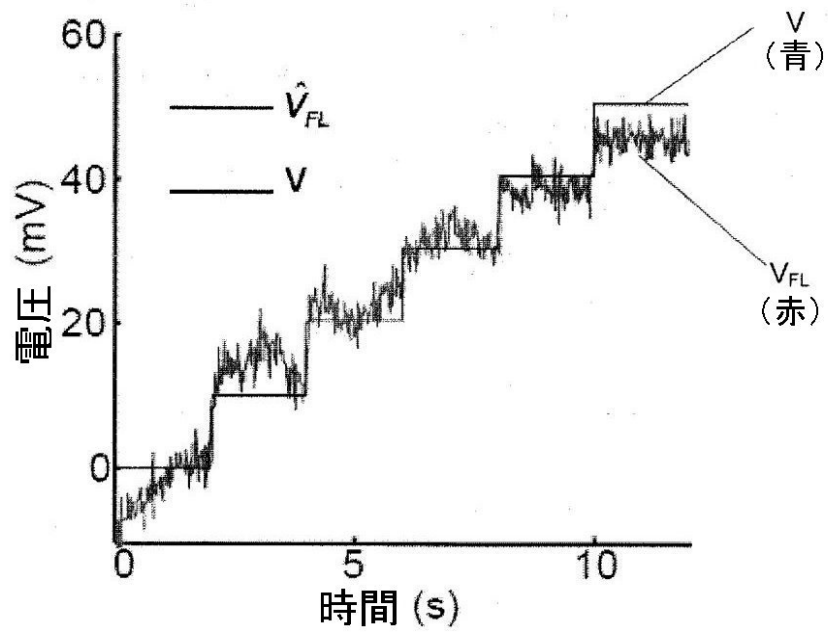


図10

【図11A - 11E】

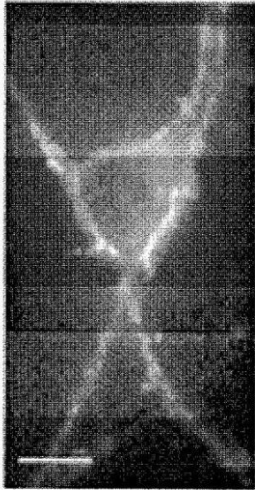


図11A

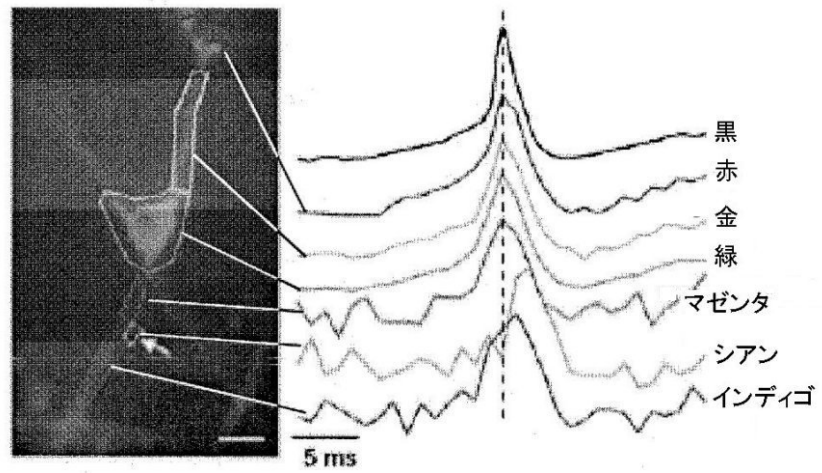


図11E

図11B

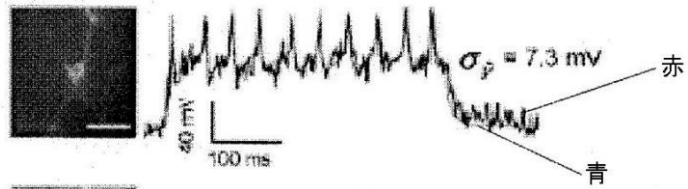


図11C

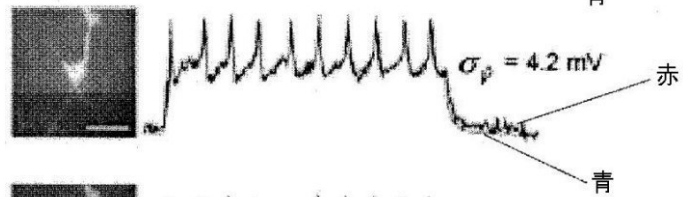
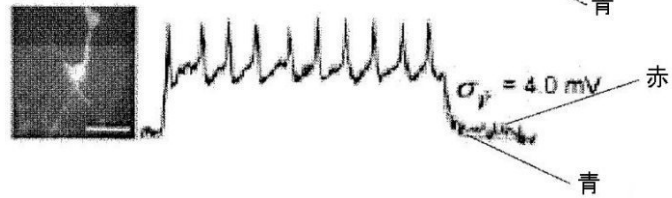


図11D



【図 1 1 F】

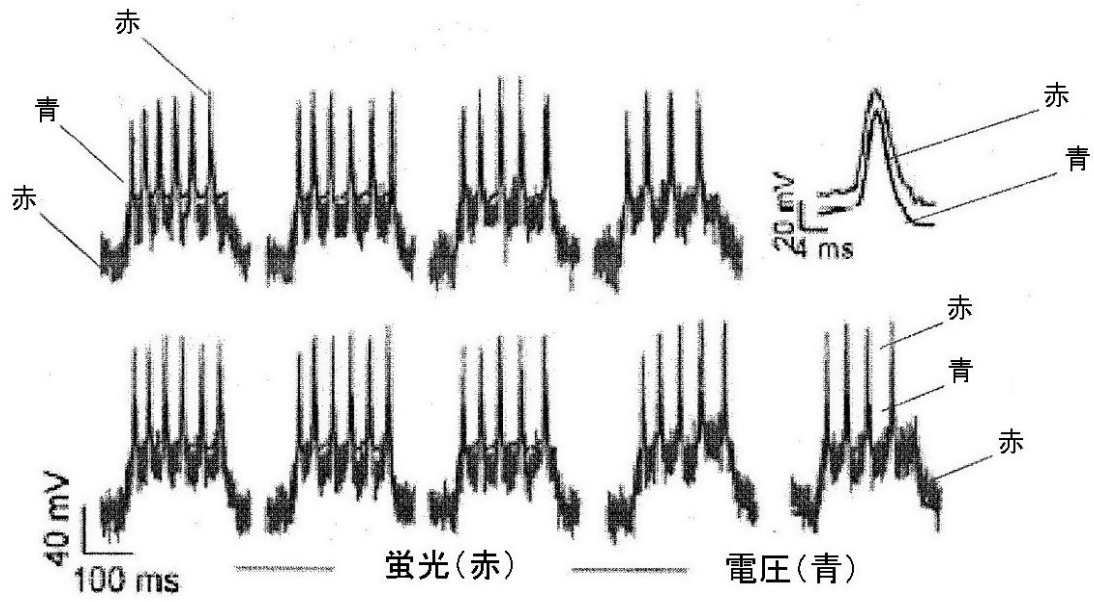


図 1 1 F

【図 1 1 G】

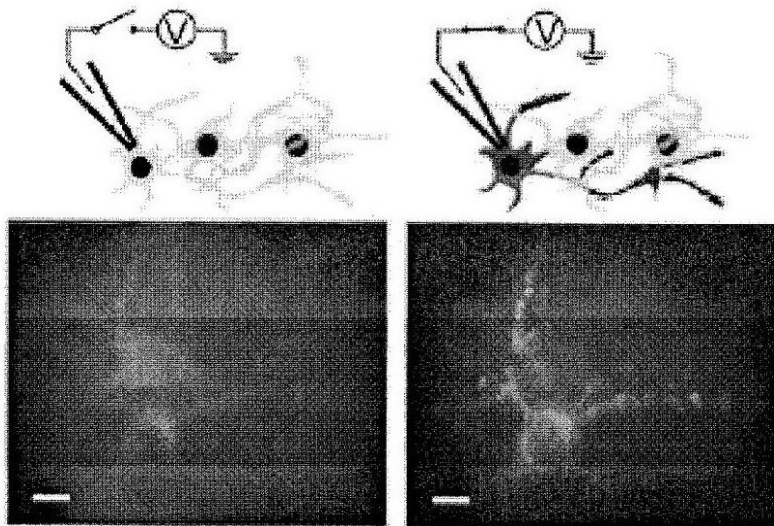


図 1 1 G

【図 1 2】

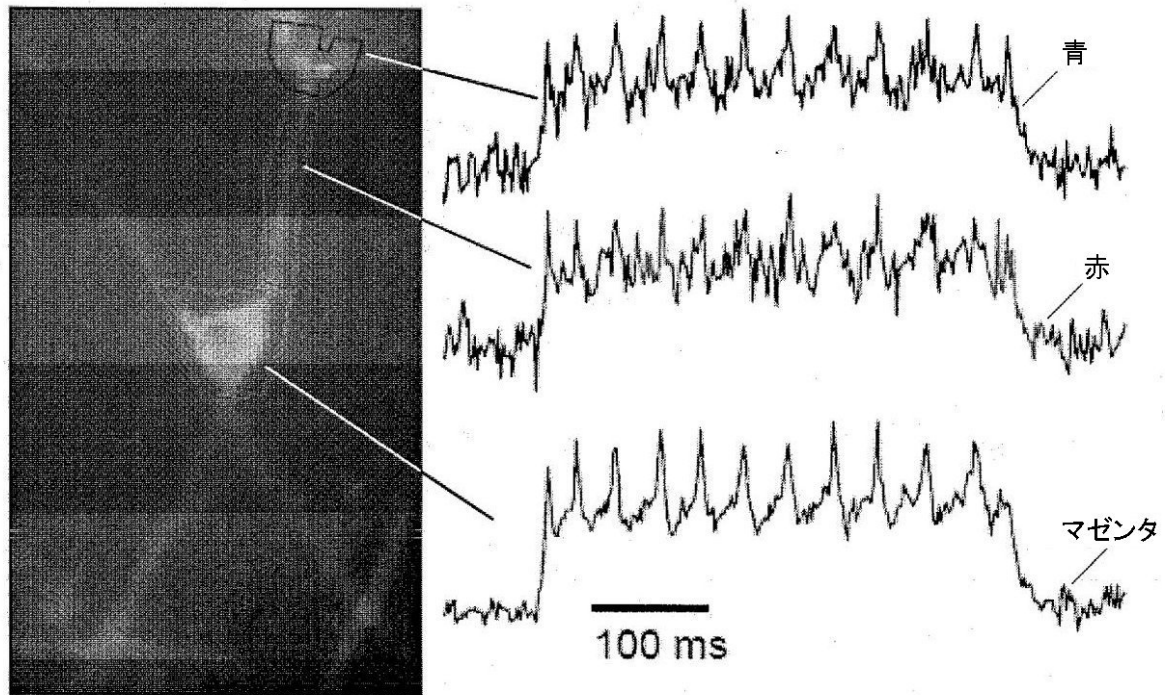


図12

【図 1 3 A】

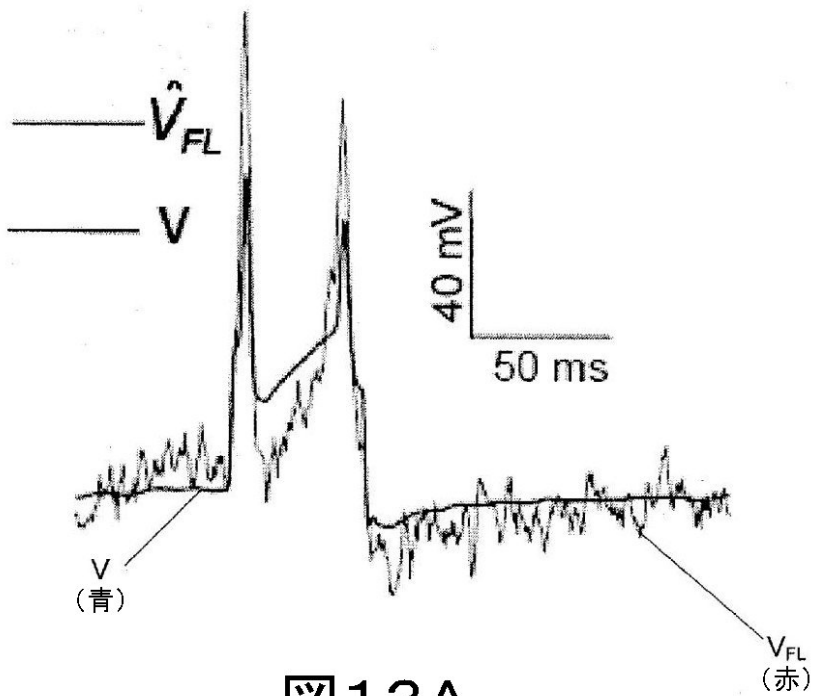


図13A

【図13B】

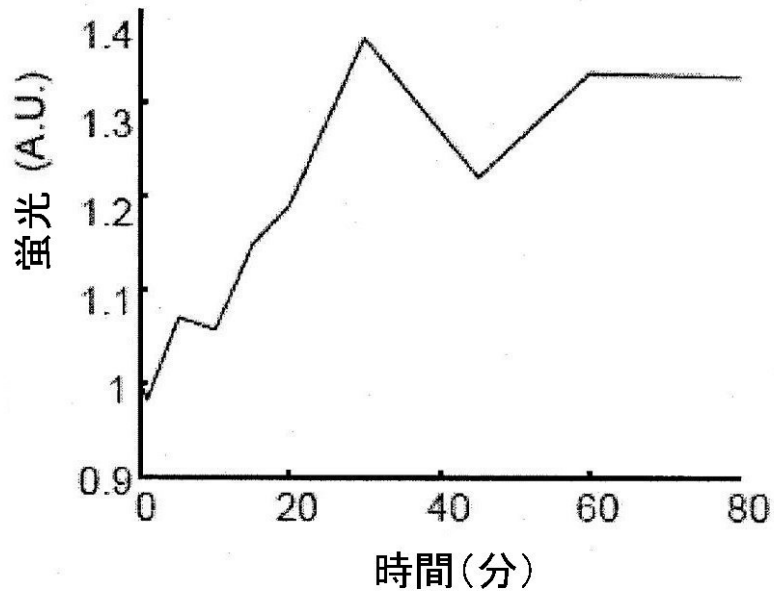


図13B

【図14A】

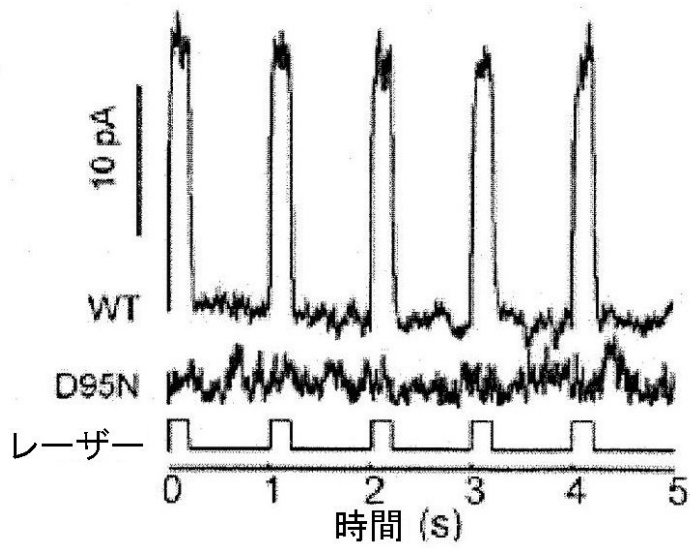


図14A

【図14B】

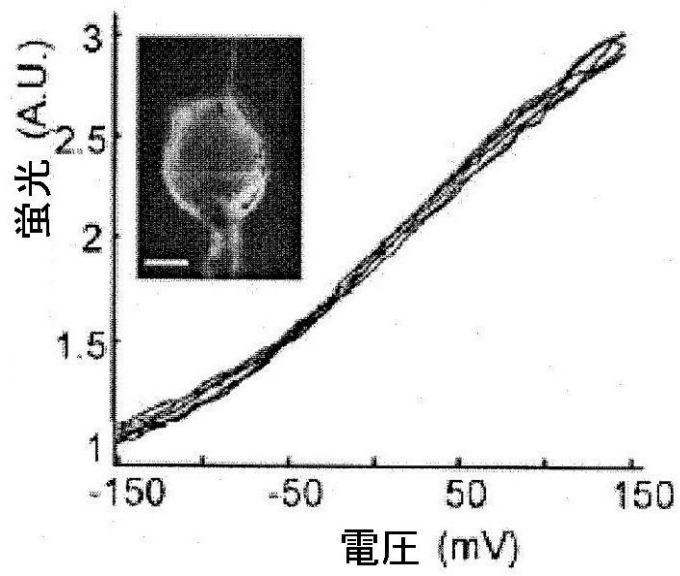


図14B

【図14C】

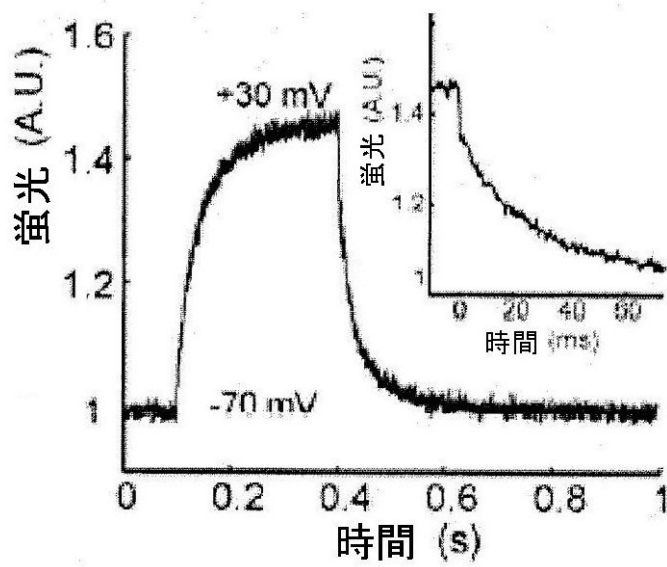


図14C

【図14D】

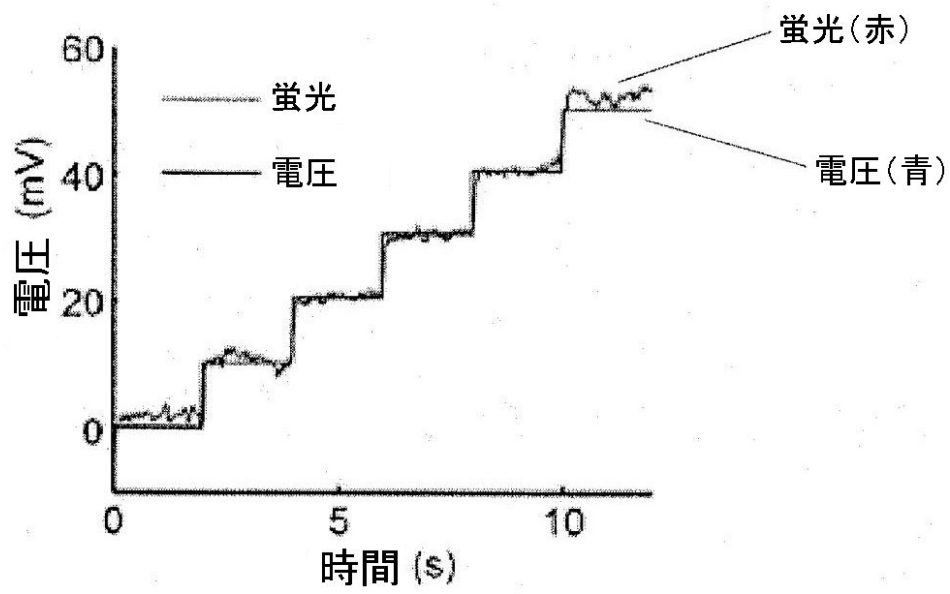


図14D

【図15】

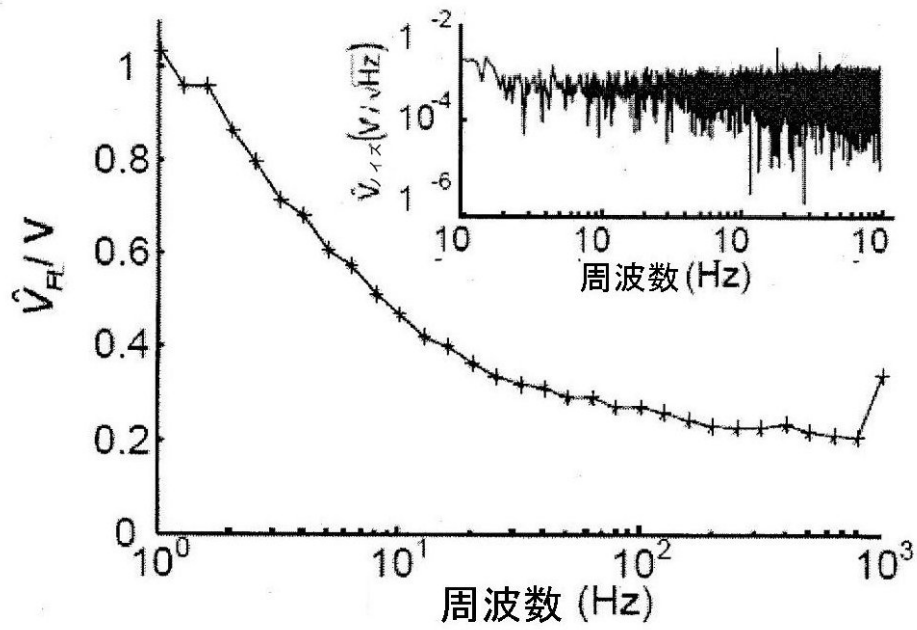


図15

【図16A - 16D】

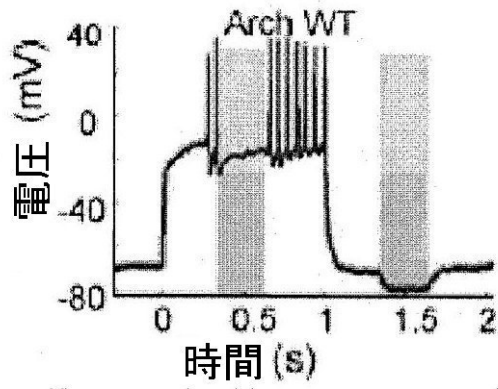


図16A

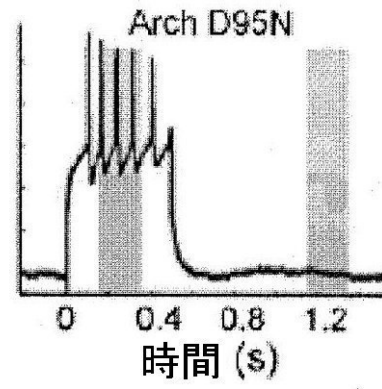


図16B

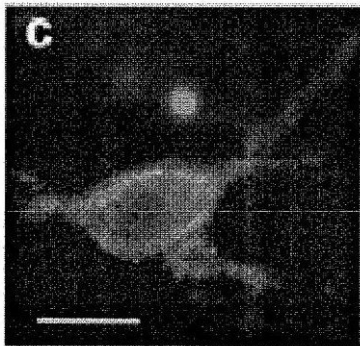


図16C

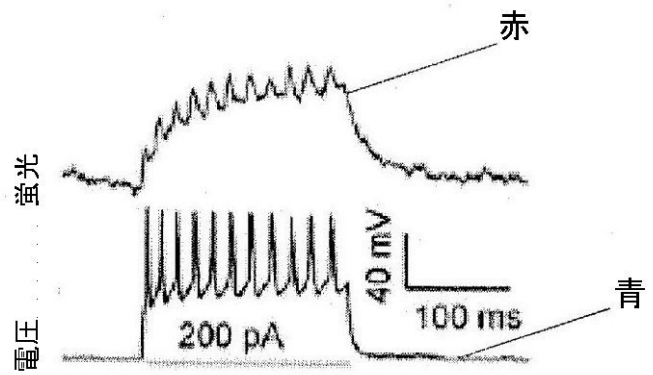


図16D

【図17】

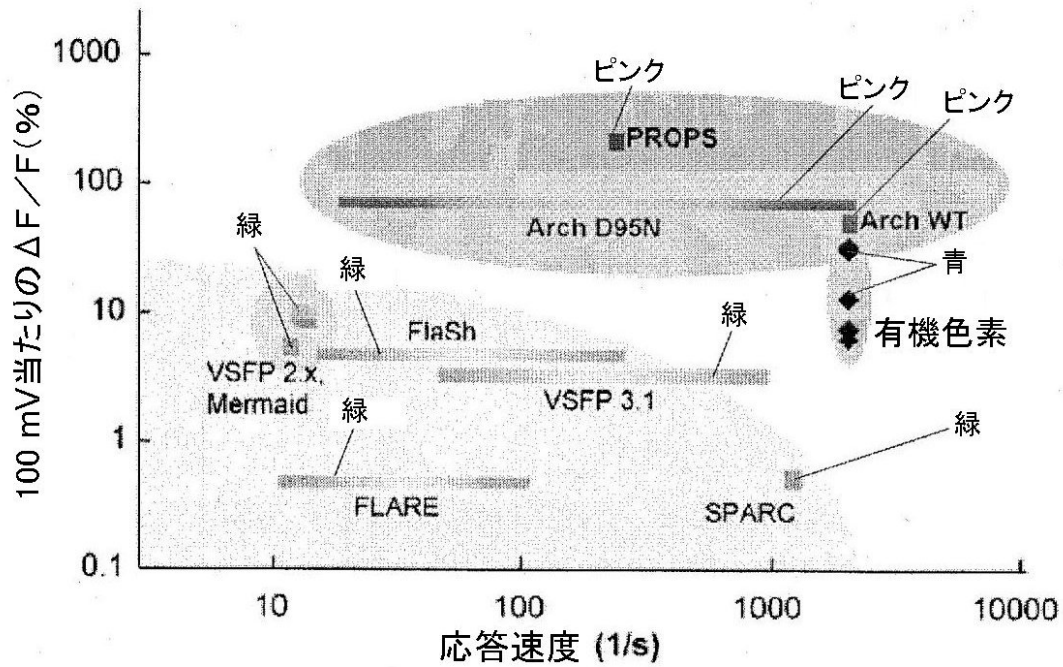


図17

【図18A】

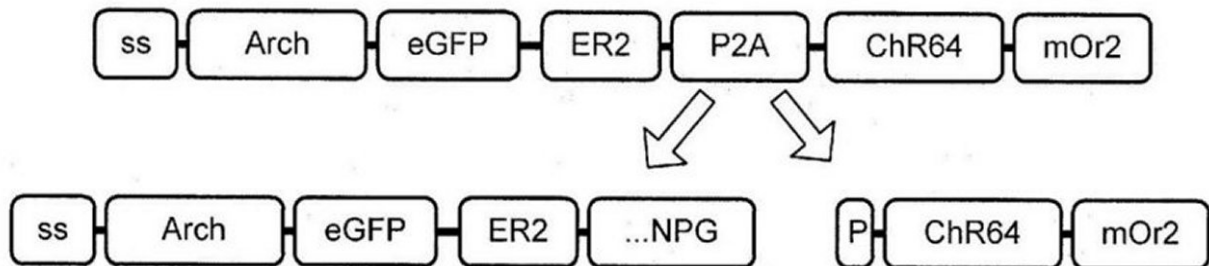


図18A

【図 18 B】

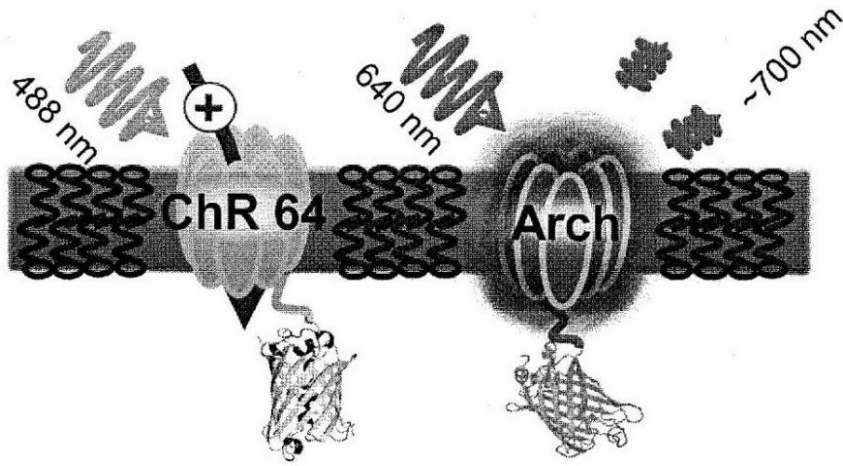


図 18B

【図 18 C】

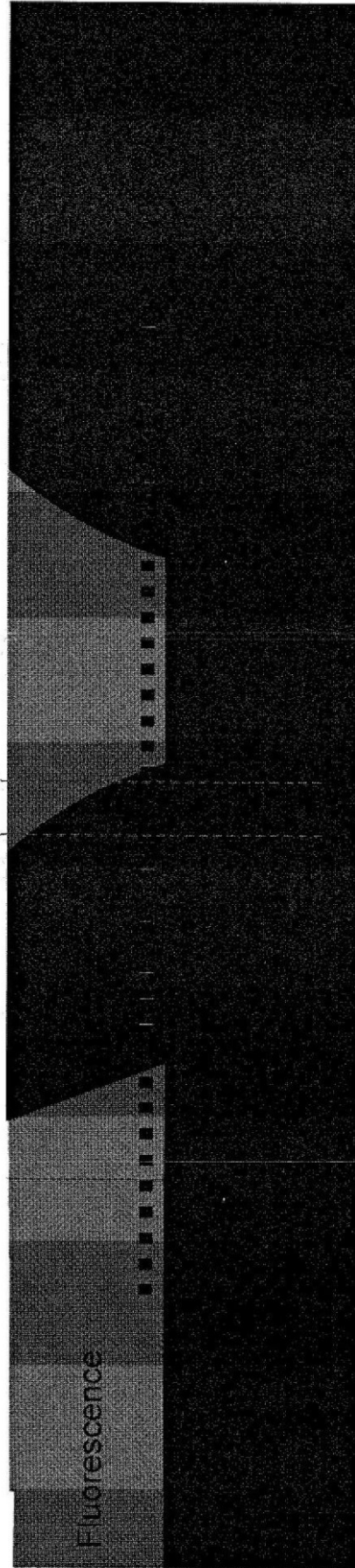
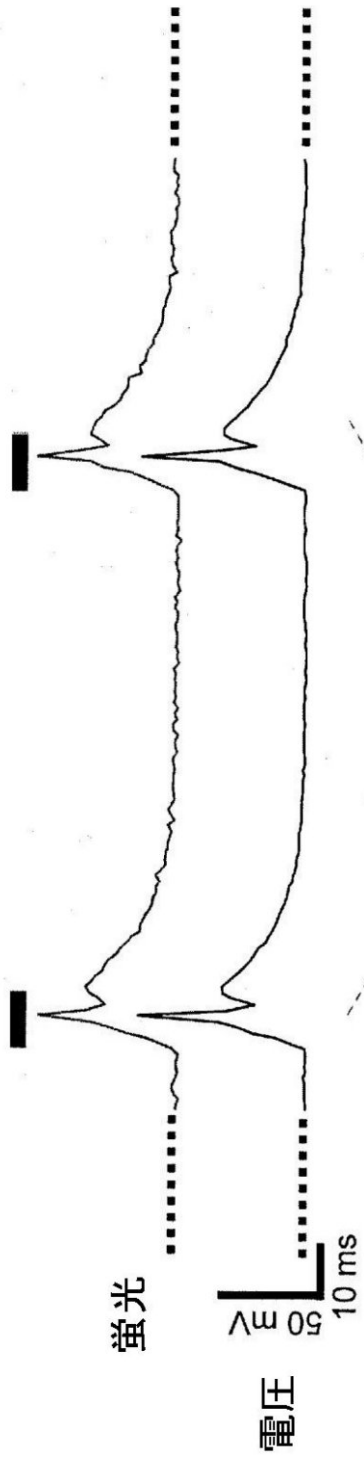


図18C

【図 19 A】

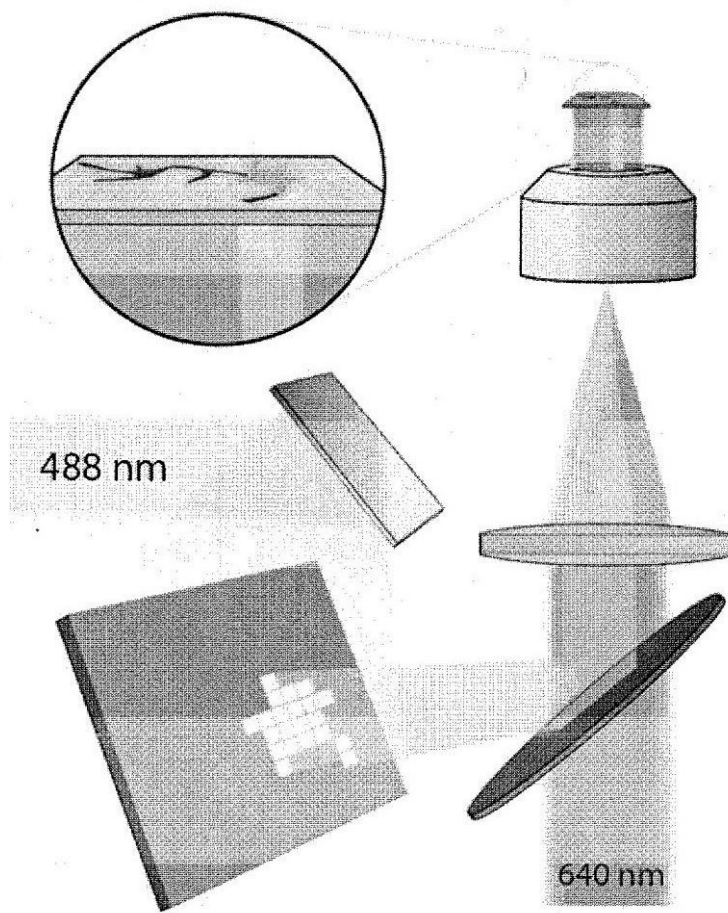


図 19A

【図 19 B】

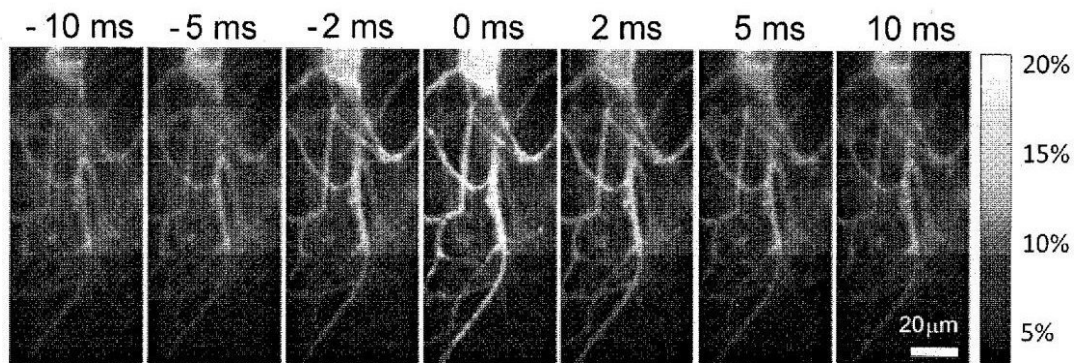


図 19B

【図20A - 20B】



図20A

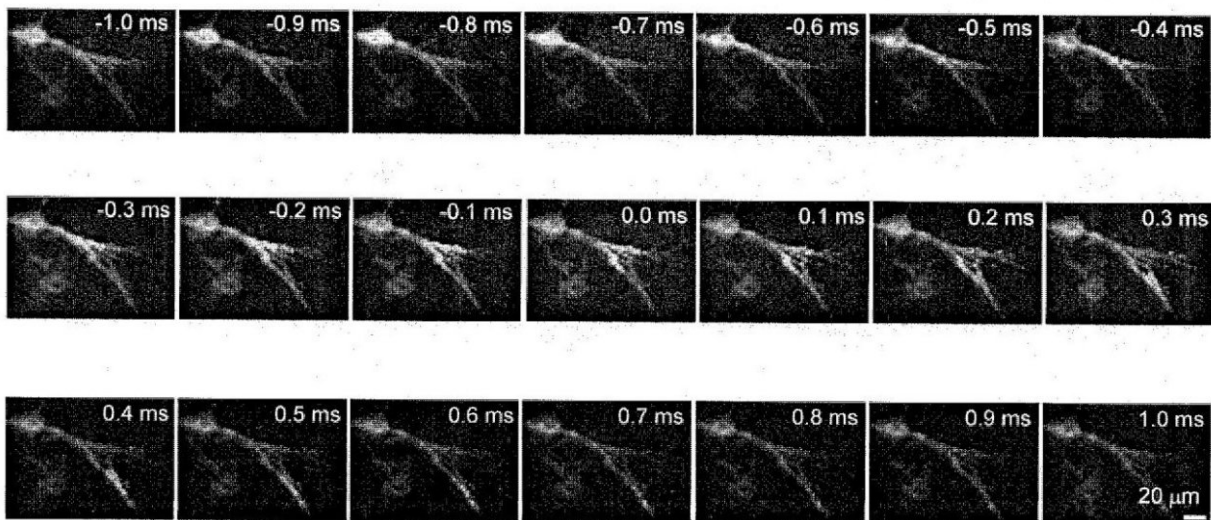


図20B

【配列表】

2015505979000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/066303

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G02B21/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G02B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/027446 A2 (GALENEA CORP [US]; GERBER DAVID J [US]; COTTRELL JEFFREY R [US]; RYAN) 11 March 2010 (2010-03-11) paragraphs [0172] - [0180]; figures 10,11 -----	1-7, 12-14, 29,30
X	EP 2 023 127 A1 (OLYMPUS CORP [JP]) 11 February 2009 (2009-02-11) paragraphs [0279], [0280] -----	1-7, 12-14, 29,30
X	WO 2008/149055 A1 (GEN ELECTRIC [US]; GE HEALTHCARE UK LTD [GB]; RITTSCHER JENS [US]; SEB) 11 December 2008 (2008-12-11) paragraph [0039]; figure 3 -----	1-7, 12-14, 29,30
L	US 2002/021490 A1 (KASAHARA TAKASHI [JP] ET AL) 21 February 2002 (2002-02-21) paragraphs [0036], [0047]; figures 1,4 -----	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 March 2013		28/05/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Hambach, Dirk

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/US2012/066303

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-7, 12-14, 29, 30

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2012/066303

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7, 12-14, 29, 30

Time serie interpolation

2. claims: 8-11

Selecting a detector for fluorescence measurements

3. claims: 15-18

Choice of fitting function

4. claims: 19-28

Event detection

5. claims: 31-43, 46, 51, 52

Microscope with continuously variable magnification

6. claims: 44, 45

Alternative illumination modes

7. claims: 47-50

Improvement of the microscopes light efficiency

8. claims: 53-58

Adjustment of the illumination light

9. claims: 59-75

Study of voltage-indicating proteins at different wavelengths

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/066303

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010027446 A2	11-03-2010	AU 2009288657 A1 CA 2744804 A1 CN 102203622 A EP 2329275 A2 JP 2012501646 A KR 20110073494 A US 2012053084 A1 WO 2010027446 A2	11-03-2010 11-03-2010 28-09-2011 08-06-2011 26-01-2012 29-06-2011 01-03-2012 11-03-2010
EP 2023127 A1	11-02-2009	CN 101438147 A EP 2023127 A1 US 2009086314 A1 WO 2007139201 A1	20-05-2009 11-02-2009 02-04-2009 06-12-2007
WO 2008149055 A1	11-12-2008	CA 2689474 A1 EP 2153411 A1 JP 2010538603 A US 2008304732 A1 WO 2008149055 A1	12-11-2008 17-02-2010 16-12-2010 11-12-2008 11-12-2008
US 2002021490 A1	21-02-2002	JP 2002031758 A US 2002021490 A1	31-01-2002 21-02-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/48 (2006.01)		G 0 1 N 33/48	P	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)		C 1 2 Q 1/04		
C 1 2 M 1/00 (2006.01)		C 1 2 M 1/00	A	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)		C 1 2 M 1/34	B	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 M 1/34	Z	
		C 1 2 N 15/00	A	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 マクローリン, ドゥーガル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 8、ケンブリッジ、アッシュトン プレイス 9

(72)発明者 ホッホバウム, ダニエル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9、ケンブリッジ、パール ストリート 4 8

(72)発明者 クラリ, ジョエル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 4、サマービル、フェアリー ストリート 1、
1

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA06 DA05 DA06 EA01 FA01 FA02 FA03 FA06
HA01 HA02 HA09 JA03 KA02 KA09 LA02 LA03 NA01 NA04
NA05 NA06
2G045 AA24 AA40 BA13 BA14 BB20 DA30 DA36 DA57 DA72 FA16
FA29 FB03 FB12 FB15 GB01 GC15 GC19 JA01 JA04 JA07
2H052 AA09 AB02 AB05 AB29 AC04 AC08 AC14 AC22 AC27 AF14
4B024 AA11 AA20 BA80 CA04 DA03 GA13 HA11
4B029 AA07 BB11 CC03 CC08 FA01 FA12 FA15 GB06
4B063 QA18 QA20 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS38 QS39 QX01