

## 極めて多数個の一分子に対する蛍光イメージの自動解析ツール開発

(大阪大学<sup>1</sup>・大阪公立大学 LAC-SYS 研究所<sup>2</sup>) ○栢野 智<sup>1</sup>・伊都 将司<sup>1,2</sup>

Development of auto-analyzing tool for huge numbers of single-molecule fluorescence images.  
(<sup>1</sup>Osaka University, <sup>2</sup>RILACS, Osaka Metropolitan University) ○Satoshi Kayano,<sup>1</sup> Syoji Ito,<sup>1,2</sup>

Single molecule tracking (SMT) enables to track the lateral diffusion of molecules with a high accuracy ( $< 10$  nm). Detailed tracking of guest molecules in host materials and successive analysis provide the information on the internal structure of the host materials and the spatial distribution of translational diffusion coefficient. In this material evaluation, the increase in the number of observed molecules leads to the improvement of the spatial accuracy of evaluation. Recently, we have developed a SMT method using fluorescence-switchable dyes and successfully observed  $> 10000$  of single molecules for several hours<sup>1)</sup>. We applied this approach to a polymer alloy and, visualized the microscopic phase-separation structure and translational diffusion coefficient distributions<sup>2)</sup>. To advance this method as a widely applicable evaluation technique, reducing the time for data analysis is a key challenge. In this study, we addressed this challenge by developing a Python-based analysis code. This code automates the determination of molecular positions in each frame of a fluorescence movie and tracks their temporal evolutions. Our approach includes a molecule discriminant method taking into account the variations molecule by molecule in signal-to-noise ratio, size, and shape of fluorescence spot, ensuring highly accurate molecule detection. Additionally, we improved processing speed through parallelization and optimization of calls for image-processing libraries.

**Keywords :** *single-molecule fluorescence image, auto-analysis, single-molecule tracking*

単一分子追跡法は、高精度 ( $< 10$  nm) に分子追跡が可能な手法であり、材料中の蛍光分子の追跡から、材料のナノ構造や、材料中の並進拡散係数の空間分布などの情報取得が可能である。この材料評価において、観測分子数の増加は構造・物性評価の空間精度向上につながるため非常に重要である。近年我々は、蛍光スイッチング分子を用いて数千～数万個以上の単一分子を顕微鏡視野内で数時間にわたり観察することに成功し<sup>1)</sup>、それを応用し高分子固体のミクロ相分離構造と相界面に特異的な並進拡散係数分布の超解像可視化に成功した<sup>2)</sup>。この手法を一般的な評価手法にする上で、データ解析時間の短縮が重要な課題である。そこで本研究では、蛍光動画の各フレーム中の分子位置決定とその経時変化追跡の自動化を主眼に Python を用いた解析コードを開発した。蛍光の SN 比や形状・サイズ等、分子ごとに異なる蛍光強度の空間分布を考慮した判別手法を構築し精度の高い分子検出を実現し、さらに並列化、画像処理呼出の適切化により速度向上に成功した。

1) Arai, Y. et al, Chem. Commun. 2017, 53, 4066.

2) Ito, S. et al, Polym. Chem. 2022, 13, 736.

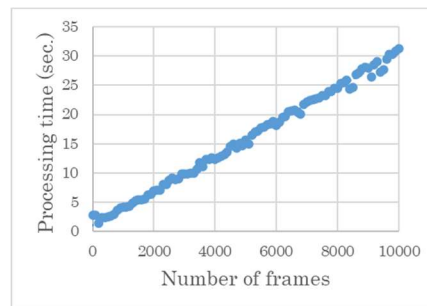


Fig. 1. Processing time as a function of the number of video frames analyzed.