

超解像蛍光顕微鏡法

堀田 純一, 羽鳥 晋由

1 はじめに

レーザーは、数多くの分析技術に革命的な進歩を与えてきた。顕微蛍光測定光源としても時間・空間・エネルギーを物理的な限界まで確定することが可能であり、発振波長以外の光を出さないレーザーは、微小空間から発するわずかな蛍光を励起光から波長選択フィルターにより分離しやすいという点で大きな進歩をもたらした。しかしながら、光を用いる測定法には光の回折限界という空間分解能の壁が存在し、顕微蛍光測定もその例外ではなかった。この光の回折限界の壁は、本企画のテーマであるレーザーからの光をいかに高性能なレンズを用いても集光したとしても、ある一定の大きさ以下の集光スポットにすることができない限界でもある。光学顕微鏡像の結像についても限界は同じであり、光を測定に用いる限りこの空間分解能の壁を乗り越えることはできないと考えられてきた。それを可能としたのが、本稿で紹介する単一分子分光に基づく超解像蛍光顕微鏡法であり、レーザーなくしては実現できなかった分析技術である。超解像蛍光顕微鏡法は比較的新しい分析技術であり、その開発に貢献した Eric Betzig, Stefan W. Hell, William E. Moerner の3氏が2014年のノーベル化学賞を受賞している。現在、超解像蛍光顕微鏡法と呼ばれる分析技術は、測定原理によりいくつかの種類に分類される。単一分子の位置測定に基づく局在化顕微鏡法、誘導放出により蛍光を抑制して蛍光スポットのサイズを小さくする stimulated emission depletion (STED) 顕微鏡法、光学伝達関数の高空間周波数領域を強調することによる数学的な超解像顕微鏡法等がある。本稿では、各種超解像蛍光顕微鏡法について解説するとともに、これから超解像蛍光顕微鏡測定を始めたいと考える方の役に立つよう、比較的簡単に自作することも可能な局在化顕微鏡法について、その測定システム、試料作製、測定例について詳しく解説する。

2 超解像蛍光顕微鏡法の測定原理

一般的な光学顕微鏡の空間分解能は、アッペの式やレイリーの基準で表されるが、測定に用いる波長の半分程度の大きさである。超解像蛍光顕微鏡が蛍光顕微鏡と比較して空間分解能が高くなるということは、分解可能な空間内に含まれる蛍光色素の数が少なくなるということの意味している。例えば、空間分解能が10倍になると、分解可能な空間に含まれる分子の数は2次元の場合は1/100に、3次元の場合は1/1000になる。観測する空間、すなわち蛍光分子が存在できる空間は非常に小さくなるので、必然的に一分子レベルの感度を持つ分析技術が必要となる。このような観点から一般に超解像蛍光顕微鏡法は、単一分子分光の応用であるといえる。幸いなことに、単一光子を検出可能なアバランシェフォトダイオード、CCDカメラ、EM-CCDカメラ、sCMOSカメラ等の高性能な検出器が多数存在し、単一分子分光技術は誰にでも手が届くものとなっている。

超解像蛍光顕微鏡測定は、従来の単純に励起光を照射して蛍光を測定するという蛍光顕微鏡測定から一歩測定原理を踏み出すことによって実現される分析技術である。それぞれの超解像蛍光顕微鏡法により、希望するレベルの画像を得るためにはそれなりの準備が必要となる。ここではSTED顕微鏡法、局在化顕微鏡法、super-resolution optical fluctuation imaging法(SOFI法)、構造化照明顕微鏡法の測定原理について説明し、それぞれの超解像蛍光顕微鏡法の特徴と空間分解能についても説明する。なお、従来型蛍光顕微鏡の光学伝達関数の高周波数成分を増幅するタイプの超解像蛍光顕微鏡は、本稿では取り扱わない。

2・1 STED 顕微鏡法

レーザーはコヒーレンスが高いので、得意とするのは共焦点レーザー顕微鏡や光トラッピング等の集光条件での利用である。この局所的に集光することができる特徴を活かしたのがSTED顕微鏡法である¹⁾²⁾。STED顕微鏡法では、レーザー発振時にも生じる誘導放出を利用して超解像イメージを得る。図1にSTED顕微鏡法の測

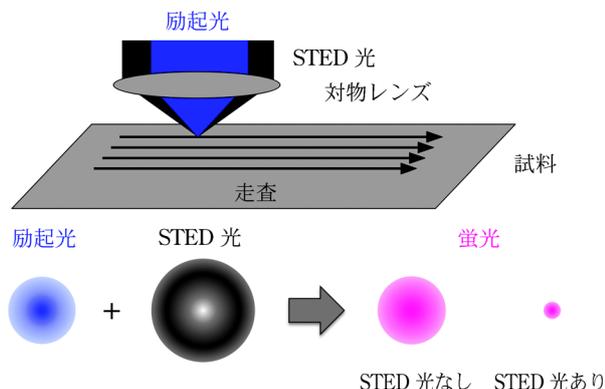


図1 STED顕微鏡法の測定原理

定原理を示す。測定システムとしては、走査型レーザー蛍光顕微鏡における蛍光色素励起用のレーザーに加えて、STED効果による蛍光抑制用のレーザー光を中心部分の光強度がゼロであるドーナツビームとして照射しながら走査して蛍光を測定する。このとき、励起の中心以外の周辺部では蛍光を発生する前に高光強度のSTED光による誘導放出が起こり、励起エネルギーはSTED光の波長の光として放出される。結果として、中心以外の場所からの蛍光は発生しないので、蛍光フィルターでSTED光をブロックすることにより周辺部のシグナルは観測されないことになる。STED顕微鏡法で最も重要なことは、ドーナツビームの中心の光強度を確実にゼロにすることとその周辺では蛍光が発生する前に確実に励起状態を失活させることである。また、STED光の波長は、誘導放出断面積が最大となる蛍光スペクトルの極大波長がSTED効果の観点からは最も好ましい。しかしながら、実際にはSTED光のアンチストークス光による励起を防ぐために蛍光の極大波長よりも長波長側に設定することが多い。STED顕微鏡法は、他の超解像蛍光顕微鏡法と異なり測定画像そのものが超解像画像となっているのも特徴の一つである。欠点は、誘導放出が起こる非常に高光強度のSTED光を照射する必要があるため、蛍光色素の退色の影響が大きいことである。これは、特殊なバッファを用いることによりある程度軽減することができる。また、励起状態を回折限界以下の微小領域に制限することが可能であるため、光ナノ加工への応用も可能である。空間分解能は、使用する蛍光色素とSTED光に用いられるレーザー光強度にもよるが、STED顕微鏡での使用が推奨される蛍光色素を用いると、観測波長の1/10程度の空間分解能が得られる。もしSTED顕微鏡を自作したいという方がいらっしゃった場合は、最近執筆した他の学会誌の基礎講座³⁾に詳細があるのでそちらをご参照いただきたい。

2・2 局在化顕微鏡法

局在化顕微鏡法^{4)~6)}では、はじめに蛍光分子の蛍光像

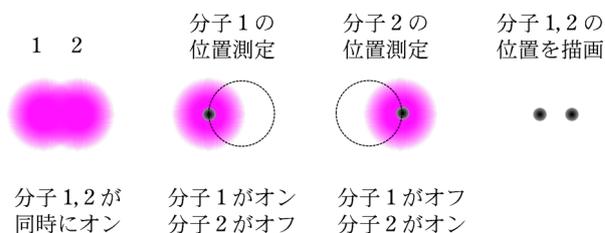


図2 局在化顕微鏡法の測定原理

を一分子ずつに分離して計測できる状態にしてそれぞれ単一分子蛍光像を多数撮影し、個々の分子の位置を測定する。そこで、試料面を一樣照明するために光強度の高いレーザー光による照明が用いられる。かつてレーザーは、顕微鏡下の一樣照明蛍光の励起用照明には向かないとされていたが、光学素子の品質の向上等により比較的縞模様が目立たなくなったことや、単一分子の分光測定では照明光のパワーが必要であることもあり、顕微鏡下の一樣照明にも広く使われるようになった。

図2に局在化顕微鏡法の測定原理を示す。ここでは、二つの分子が近接しており、同時に蛍光を発生する場合には一つの輝点として観測されている。ここで、分子1だけがオン状態で蛍光し、分子2はオフ状態で蛍光しないとすると、分子1からの蛍光像を撮像することができ、分子1の位置を決定できる。次に、分子1はオフ状態であり、分子2がオン状態である場合は、分子2の蛍光像を撮像して、分子2の位置を決定できる。多数の分子がある場合についても、分子の蛍光像同士が重ならない程度に蛍光分子のオン状態の数が制限できれば、個々の蛍光像を撮像してその位置を決定することができる。こうして決定した位置情報とその推定精度をもとに、蛍光色素のマップを再構成することにより、局在化顕微鏡像が得られる。

単一分子像を解析して分子の位置測定を行うためには、蛍光像の中心位置を決める必要がある。位置を決めるためには、蛍光像の重心を求めたり、理論的に予想される蛍光像にフィッティングしたり、様々なアルゴリズムが用いられる。例えば、2次元での位置をフィッティングで決める場合には、少なくとも数ピクセルに蛍光イメージを分割して測定する必要がある。フィッティングに使用する理論的な蛍光像は、2次元ガウシアンが用いられることが多い。分子の位置の推定精度は、単一分子像に含まれる光子数やフィッティング精度および信号雑音比などから求められる。その後、蛍光分子の位置と位置の推定精度を用いて蛍光分子のマップを作成して超解像イメージを得る。非常に密に存在する蛍光分子でも、光化学特性を利用して蛍光をオンオフしてその中の一部だけが蛍光する状態を作り出すことにより、一分子の位置をそれぞれ測定できる。光活性化する蛍光分子や蛍光タンパク質を用いる場合は、photoactivated localization

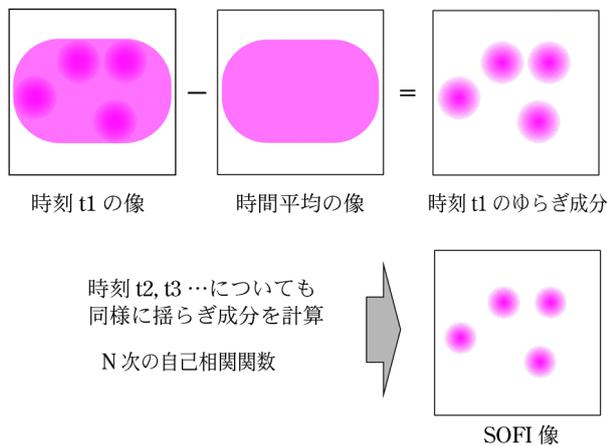


図3 SOFI法の測定原理

microscopy (PALM)⁴⁾と呼ばれ、蛍光色素の明滅を利用する場合には stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)⁶⁾と呼ばれるが、測定装置と解析方法は同じである。その他にも、数多くの局在化顕微鏡法はあるが、基本的な原理は同じである。空間分解能は、蛍光分子像に含まれるフォトン数によるが、比較的簡単に観測波長の1/20程度の空間分解能が得られる。

2.3 SOFI法

SOFI法⁷⁾は、蛍光像から各蛍光分子の蛍光強度の揺らぎ成分から超解像イメージを得る手法である。図3にSOFI法の測定原理を示す。SOFI法においても、はじめに試料の蛍光像をカメラで撮像する。各時刻の蛍光像から、ある程度の時間での蛍光像の時間平均を差し引くと蛍光像の揺らぎ成分を得ることができる。SOFI法では、単一分子像のレベルまで蛍光している分子の数を減らす必要がないため、局在化顕微鏡法と比較すると要求される条件は厳しくない。局在化顕微鏡法用の試料を作製して、予想したほど蛍光分子が明滅しなかった場合におすすめの解析方法でもある。また、一分子ごとに測定するわけではないので、測定時間が比較的短くて済むことも特徴の一つである。この蛍光像の揺らぎ成分の自己相関関数を計算することにより、超解像イメージを得ることができる。個々の蛍光分子の蛍光イメージは、2次元ガウス関数で近似することができるので、自己相関関数の次数の平方根に反比例するだけで半値全幅すなわち空間分解能が改善することになる。理論的には高次の自己相関関数を使うことによりいくらかでも空間分解能を向上させることができるが、実際は信号雑音比により制限を受けるので、3次の自己相関関数程度までというのが現実的なところである。SOFI法は、比較的安価な産業用CMOSカメラによっても測定可能であるという報告もある⁸⁾。

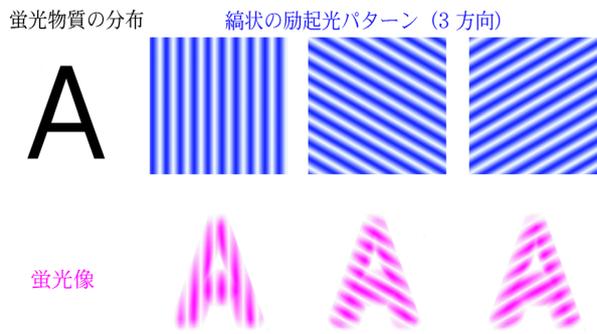


図4 構造化照明顕微鏡法の測定原理

2.4 構造化照明顕微鏡法

構造化照明顕微鏡法⁸⁾⁹⁾は、縞状のパターンで励起光を照射することにより光学伝達関数の空間周波数を拡張して、通常の蛍光顕微鏡の2倍程度の空間分解能を得ることができる方法である。図4に構造化照明顕微鏡法の測定原理を示す。測定対象と縞状の照明光パターンのモアレ干渉縞をカメラで測定し、照明光パターンの方向と位相をいくつか変えて測定した後、測定対象の形状を再構成する。また、通常の励起光強度条件下で空間分解能を向上することができるので使いやすい。構造化照明顕微鏡法の初期の論文では、非常に強い励起光を用いて蛍光分子の励起を飽和させることで、さらに高い空間分解能が得られる測定原理が提案されたが、蛍光色素の退色の問題があり現実には困難であった。この原理を応用した構造化照明顕微鏡法の照明パターンによる光スイッチング蛍光タンパク質のオフ状態とオフ状態の切り替えを行うタイプの超解像蛍光顕微鏡法は、比較的低い励起光強度で飽和させることができる。将来的には、この原理を用いる光スイッチング顕微鏡が広く使われるようになるかもしれない。

3 超解像蛍光顕微鏡法の測定系の例

ここでは、比較的自作することが容易な超解像蛍光顕微鏡である局在化顕微鏡の測定システム、試料作製法、測定例について解説する。

3.1 超解像蛍光顕微鏡（局在化顕微鏡の測定システム）の例

局在化顕微鏡は、前述の通りレーザー光による一様照明と高感度カメラにより測定した単一分子の蛍光像を解析することにより超解像イメージを得る。励起用のレーザーには、半導体レーザーまたは全固体レーザーが用いられる。励起用のレーザーのパワーは出射口で少なくとも100 mW程度は必要となる。レーザー光により一様照明を行うために、対物面の後側開口面にフォーカスする。レーザー光により励起した一分子からの蛍光を蛍光フィルターにより励起光から分離して測定する。単一分子像は、高開口数の対物レンズを用いる方がシャープに

なり超解像イメージの分解能も高くなるので、通常は高開口数の全反射対物レンズが用いられる。市販のシステムでは、全反射条件で励起するシステムが多く、全反射による励起が可能な極表面のみの観察であるために、薄っぺらな像しか撮像できないと指摘されることもある。自作したシステムでは全反射条件を意図的に外した照明も可能であり、この問題は軽減される。

カメラに結像する単一分子のイメージは、前述の通り数ピクセルに結像する必要がある。蛍光が可視光の領域である場合には、1ピクセルのサイズが80~100 nm程度になるように設定するとこの条件を満たすことができる。例えば、1ピクセルのサイズを100 nm程度にしようとする、カメラのピクセルサイズが16 μm の場合、160倍程度の倍率が必要となる。例えば、60倍の全反射対物レンズと2.5倍の中間レンズを用いて150倍の総合倍率でカメラに単一分子像を結像し、ピクセル数を512×512ピクセルとすると約50 μm 四方の視野を観察することができる。イメージ可能なエリアは、ピクセル数に依存し、1024×1024ピクセルのカメラを用いると100 μm ×100 μm の視野を、2048×2048ピクセルでは200 μm ×200 μm の視野を観察することができる。しかしながら、観察する面積すなわち励起する必要がある面積がそれぞれ4倍と16倍に増加するので、励起に必要なレーザーの出力もそれぞれ4倍と16倍になる。

実際に筆者らが使っている局在化顕微鏡システムの概略図を図5に示す。波長488 nm、100 mWの全固体レーザーからの連続発振光を励起光に用いている。励起光のパワーを1/2波長板とグランレーザープリズムにより調整し、1/4波長板により円偏光にしている。また、焦点距離15.0 mmと300 mmのレンズを用いてビーム径を20倍に拡大している。その後、焦点距離500 mmのレンズにより対物レンズ(全反射対物レンズ、60倍、NA1.49)の後側開口の位置に集光し、対物レンズと試料を通過した後にビームがコリメートされた状態になるように調整している。対物レンズからの蛍光は、2.5倍のリレーレンズを通過後EM-CCDカメラに結像する。実際の局在化顕微鏡システムを図6に示す。

3.2 試料の作製における注意点

超解像蛍光顕微鏡が能力を発揮するのは、線状やクラスタ状などの回折限界以下の構造がある試料である。細かい構造のない試料は、もともと超解像蛍光顕微鏡で測定する必要がない試料である。通常の蛍光顕微鏡では、数多くの蛍光分子を一度に測定するので単一分子レベルの雑音を考慮しなくてもよいが、超解像蛍光顕微鏡では、感度や空間分解能の両方について単一分子レベルの情報が得られる代わりに、試料作製の際に基板やバッファーなどからのバックグラウンド蛍光をできる限り押さえる必要がある。特に、カバーガラスは試料の作製前

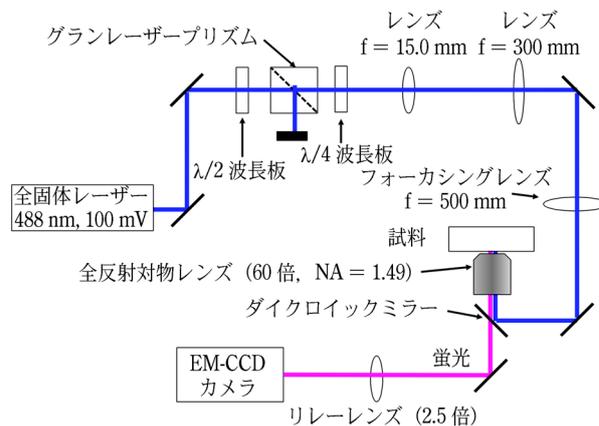


図5 局在化顕微鏡システムの概略図

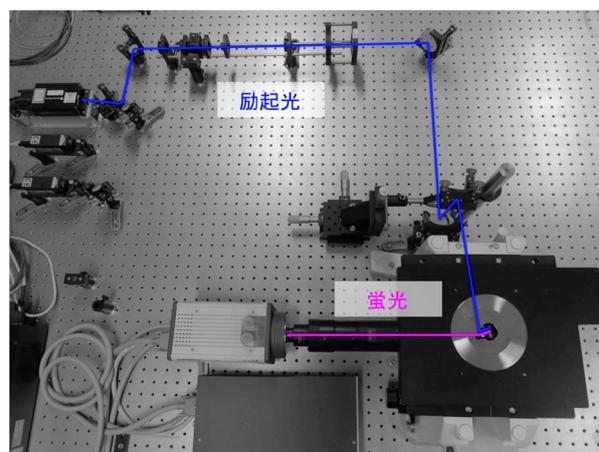


図6 局在化顕微鏡システム

に洗浄するとバックグラウンドノイズを低減できることが多い。

試料の蛍光標識には、その超解像蛍光顕微鏡測定に適した蛍光色素を用いる必要がある。通常の蛍光顕微鏡測定では、明るく退色しにくいという特性が重要とされるが、超解像蛍光顕微鏡では、蛍光のオン状態のときには明るく、オフ状態のときには暗いという特性が必要となる。必ずしも、従来優れた蛍光色素として使われてきた蛍光色素ではないものの方が良い特性を持つ可能性があるということは興味深い。

局在化顕微鏡は生物試料の測定によく用いられるが、試料観察用のセルとしてガラスボトムディッシュを使うのが簡単である。接着性の培養細胞の場合はそのまま観察可能であるし、浮遊性の培養細胞の場合もそこに沈んだ細胞を観察することができる。また、蛍光色素を明滅させるためのバッファーを入れて密封することが可能である。

細胞内の観察を行う場合には、蛍光標識に光スイッチング蛍光タンパク質を使うこともできる。観察したいタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質を細胞内で発現させて観察する。超解像蛍光顕微鏡が開発された当

初から、Dronpa, Kaede, mEOS2 などが使われているが、最近も次々と新しい光スイッチング蛍光タンパク質が開発されている。

3・3 測定例

局在化顕微鏡での測定例を二つ示す。前述の 488 nm の励起用レーザー光だけで測定可能な Alexa488 を蛍光色素として用いた。一つ目の例は、超解像蛍光顕微鏡の測定例としてよく用いられているアクチンフィラメント、二つ目の例は、比較的簡単に調製可能なパン酵母（市販のドライイースト）のアクチンである。

アクチンフィラメントの試料調製は以下の通りである。
 鶏から抽出したアクチンを超遠心分離法で精製した。アクチンモノマー（1.6 μM ）をファロイジン Alexa488（1.6 μM ）の存在下で重合させて、Alexa488 標識アクチンフィラメントを調製した。0.1 M KOH-エタノール溶液でスライドガラス（24 mm \times 50 mm, No. 1）を洗浄し乾燥させた。両面テープをスペーサーとし、カバーガラス（18 mm \times 18 mm, No. 1）を洗浄済みスライドガラスに固定させた。ミオシン溶液（1 μM ）を流し入れ、1 分後に標準液（25 mM KCl, 25 mM HEPES (pH 7.4), 4 mM MgCl_2 , 1 mM DTT）を流してリンスすることで、過剰なミオシンを洗い流した。この過程で、スライドガラス上にミオシン分子が固定される。次に 20 nM の標識アクチンフィラメント溶液に交換した。ATP 非存在下のためアクチンフィラメントはミオシンと強結合し、ミオシンを介してスライドガラス表面上に固定される。さらに観察溶液（25 mM KCl, 25 mM HEPES (pH 7.4), 4 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 100 mM cysteamine）で十分にリンスした後に、エナメルにてカバーガラス 4 辺をシールした。図 7 に測定結果を示す。局在化顕微鏡像では、単一のアクチンフィラメントのシャープなイメージが観察されている。

酵母の測定では、アンピシリンを 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した LB 培地中に市販のドライイーストを接種して室温で培養した後、4 % ホルムアルデヒドで固定した。固定した酵母を 0.2 % の Triton X-100 を添加した PBS バッファー (pH 7.4) で透過処理した後、6.6 μM のファロイジン Alexa488 のストック溶液 25 μL を酵母が分散した PBS バッファー 500 μL に添加して 1 時間インキュベーションした。その後、PBS バッファーで十分洗浄した後に、100 mM cysteamine を含む PBS バッファー中に分散し、アクチンシングルフィラメントの試料と同様にシールした。図 8 に測定結果を示す。酵母のアクチンが酵母の表面付近に点状に局在している様子が観察されている。

4 まとめ

本稿では、様々な超解像蛍光顕微鏡の測定原理と実際

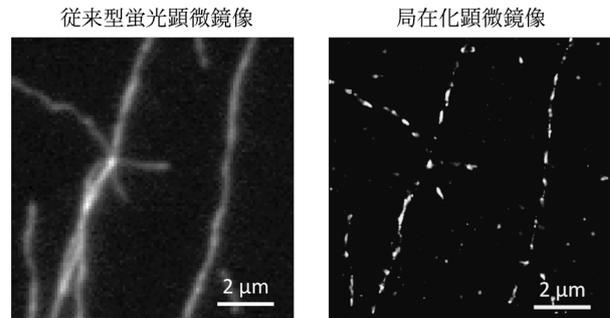


図 7 局在化顕微鏡法による測定例（単一のアクチンフィラメント）

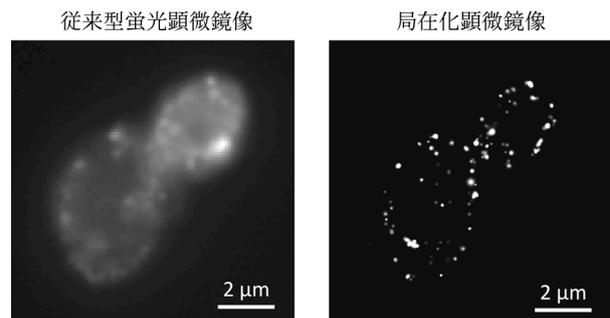


図 8 局在化顕微鏡法による測定例（酵母）

の測定系の例について試料調製法も含めて解説した。超解像蛍光顕微鏡法によって、光の回折限界による空間分解能の限界の問題そのものがなくなったわけではなく、それを巧みに回避する方法が開発されたということが興味深いところである。蛍光のオンオフを切り替えることによって超解像蛍光顕微鏡像を得ることができることから、蛍光以外の他の物理現象でも同様のことが実現できる可能性がある。その物理現象の切り替えにレーザーが利用され、様々な測定法の壁を破っていくことを期待する。

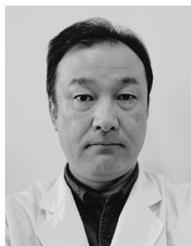
文 献

- 1) S. W. Hell, J. Wichmann : *Opt. Lett.*, **19**, 780 (1994).
- 2) T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell : *PNAS*, **97**, 8206 (2000).
- 3) 堀田純一：応用物理, **87**, 769 (2018).
- 4) E. Betzig, G. H Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess : *Science*, **313**, 1642 (2006).
- 5) M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang : *Nat. Methods.*, **3**, 793 (2006).
- 6) M. Heilemann, S. van de Linde, A. Mukherjee, M. Sauer : *Angewandte Chemie.*, **2009**, 48.
- 7) T. Dertinger, R. Colyera, G. Iyera, S. Weissa, J. Enderleind : *PNAS*, **106**, 22287 (2009).
- 8) R. Van den Eynde, A. Sandmeyer, W. Vandenberg, S. Duwé, W. Hübner, T. Huser, P. Dedeker, M. Muller : *J. Phys. Photonics*, **1**, 044001 (2019).
- 9) M. G. L. Gustafsson : *J. Microsc.*, **198**, 82 (2000).

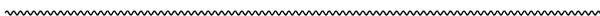
10) M. G. L. Gustafsson : *PNAS*, **102**, 13081 (2005).



堀田純一 (Jun-ichi Hotta)
山形大学大学院理工学研究科 (〒992-8510 山形県米沢市城南4丁目3-16)。大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了。博士(工学)。《現在の研究テーマ》超解像蛍光顕微鏡, 単一分子分光, 蛍光タンパク質, 珪藻。《趣味》ビザールプランツ(珍奇植物)の栽培。
E-mail : hotta@yz.yamagata-u.ac.jp



羽鳥晋由 (Kuniyuki Hatori)
山形大学大学院理工学研究科 (〒992-8510 山形県米沢市城南4丁目3-16)。長岡技術科学大学大学院工学研究科博士後期課程修了。博士(工学)。《現在の研究テーマ》モータータンパク質と細胞骨格フィラメントとの相互作用。《趣味》ワインの愛飲。
E-mail : khatori@yz.yamagata-u.ac.jp



— 会 員 の 拡 充 に 御 協 力 を !! —

本会では、個人(正会員:会費年額9,000円+入会金1,000円,学生会員:年額4,500円)及び団体会員(維持会員:年額1口79,800円,特別会員:年額30,000円,公益会員:年額28,800円)の拡充を行っております。分析化学を業務としている会社や分析化学関係の仕事に従事している人などがお知り合いにおられましたら、ぜひ本会への入会を御勧誘くださるようお願い致します。

入会の手続きなどの詳細につきましては、本会ホームページ (<http://www.jsac.jp>) の入会案内をご覧ください。下記会員係までお問い合わせください。

◇〒141-0031 東京都品川区西五反田1-26-2 五反田サンハイツ304号 (公社)日本分析化学会会員係
〔電話:03-3490-3351, FAX:03-3490-3572, E-mail:memb@jsac.or.jp〕