

光学顕微鏡を用いた蛍光検出技術

1 はじめに

微小な対象を観察する際に、顕微鏡は極めて有用な道具である。とりわけ光学顕微鏡は比較的簡単に操作でき、非破壊・非接触的であり、かつ試料の準備に際して特殊な処理を必要としないため生物学や医学等を始めとして様々な分野で広く利用されている。本稿では、特に蛍光性物質の検出のための様々な光学顕微鏡を紹介し、それぞれの仕組みや特徴についてまとめる。

2 共焦点レーザー顕微鏡

共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser scanning microscopy, CLSM) では、光源から発せられたレーザービームが試料上で焦点を結び、試料由来の蛍光が検出器のピンホールにおいて再度焦点を結ぶよう設計されている。検出に際して焦点面以外からの不要な光を除去できるためコントラストの高い鮮明な画像が得られる他、深さ方向にも1~数 μm 程度分解能を持つため、レーザー走査によって観察対象の三次元構造を解析することが可能である。デメリットとしては、焦点面を逐次的に走査していくため画像生成に時間がかかる点や、比較的高いレーザー強度が要求されるため試料の光退色や変性が問題となり得る点等が挙げられる。

3 全反射照明蛍光顕微鏡

全反射照明蛍光 (total internal reflection fluorescence, TIRF) 顕微鏡では、屈折率の異なる二つの媒質の界面に光を全反射させた際に界面外にわずかに染み出す光 (エバネッセント光) を利用することで界面近傍のごく限られた領域に存在する蛍光性物質を検出する。ノイズ光を低減した鮮明な画像が得られるだけでなく、細胞膜上等の限られた領域で生じる現象の極めて解像度の高い解析が可能である。このような利点と表裏一体ではあるが、界面近傍以外の領域、すなわち試料の内部で起こる現象を検出できない点が本方法の欠点と言える。

4 蛍光寿命顕微鏡 (FLIM)

蛍光寿命顕微鏡 (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) では、蛍光シグナルの強度ではなくパルス光照射によって生じる蛍光の時間依存性を検出する。光を照射された蛍光性物質は励起状態となり、蛍光という形でエネルギーを放出することで基底状態へと戻る。この蛍光の減衰時間 (蛍光寿命) は照射した光の強度や蛍

光性物質の濃度に依存せず、蛍光性物質固有の性質とその周辺の溶媒等の微小環境によってのみ変化する。したがって、生物学的反応プロセスのダイナミクスや分子間相互作用、分子の状態の変化を精密かつ直接的に測定することが可能である。その反面、測定時間が長くなることで高速なプロセスを観察することは他の顕微鏡と比べて困難な場合が多い。検出法にはシグナルの減衰を直接測定する time domain 方式や検出系と蛍光との位相差から蛍光寿命を導出する frequency domain 方式がある。

5 多光子励起顕微鏡

多光子励起顕微鏡 (multiphoton excitation microscopy) では、蛍光性物質への光照射に際して二つ以上の光子を同時に吸収させることで励起を行う。1光子あたりに必要とされるエネルギーが小さくなることで、励起光の波長を伸ばすことができる。これにより、生体内での光透過性が高くなり深部までの観察が可能となる他、試料の変性や観察対象へのダメージを軽減することができる。このように、本方法は生体内での測定に適した性質を有する。一方で、多光子吸収過程をごく限られた領域に集中して引き起こす必要があることから、広い面での観察を苦手とする。

6 超解像顕微鏡

光は波動性を持つため、試料から発せられた蛍光を1点に集めることは不可能であり、不確かさを含む状態で観測される。このため二つの蛍光の発生源が一定の距離よりも近づくと、それぞれに由来するシグナルを分離することができなくなる。これを回折限界と呼び、レンズの開口数と蛍光波長による定式化が報告されている¹⁾。これによれば、可視光 (400~750 nm 程度) を用いた検出を行う限り回折限界は数百 nm のあたりに存在し、それよりも小さな構造を解析することは原理的に不可能となる。このため、従来の光学顕微鏡では生体内の微小な構造等を観察するには限界があった。この解像度の限界を打ち破り、物質の構造や性質をより詳細に観察するための技術が数多く考案されている。

6・1 Stimulated emission depletion (STED)

STED²⁾では、光励起された試料にドーナツ型のSTED光を照射する。STED光が当たった蛍光分子は誘導放出によって強制的に基底状態へと戻り、その蛍光シグナルは検出対象から外れる。これによりドーナツの中空に位置する対象分子からのシグナルだけが、隣接する

分子からの干渉を受けることなく検出可能となる。STED光の形状を調整することで数nmから数十nmに至るまで解像度を向上させることが可能であるが、原理上深さ方向の解像度を上げることはできないという欠点がある。

6・2 Single-molecule localization microscopy (SMLM)

SMLMでは、試料中のすべての蛍光分子を同時に光らせるのではなく、確率的に回折限界内に単一の蛍光分子のみしか蛍光を発しないようなまばらな蛍光シグナルを得られるように実験条件を設定する。本手法に相当する技術として photoactivated localization microscopy (PALM)³⁾, fluorescence photoactivation localization microscopy (FPALM)⁴⁾, stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)⁵⁾ 等様々な方法が報告されている。撮像ごとに蛍光を発する分子を変えながら何度も画像を取得し、それぞれの輝点の位置を特定した後にこれらを一つに統合することで、超解像画像へと再構築する。本手法はSTEDと比較して深さ方向の解像度も向上させることができるが、高濃度の添加剤を使用する等、蛍光のon/offを制御するため実験条件に制限が生じ得る他、一枚の画像を取得するのに時間がかかり観測対象の動的変化を追うことが難しいという欠点がある。

6・3 Structured illumination microscopy (SIM)

SIM⁶⁾は、モアレ現象を利用した方法である。試料に対して縞状の励起光を角度・位相を変えて複数パターン照射すると、試料中の微細構造の情報を含んだ干渉縞が生じる。これを解析することで超解像画像を取得する。他の手法と比較して解像度の向上率は劣る傾向にあるが、試料に特殊な実験条件を必要とせず、高速な撮像も可能である。

6・4 Minimal photon fluxes (MINFLUX)

MINFLUX⁷⁾はSTEDの開発者であるStefan Hellらによって新たに開発された方法である。本方法ではSMLMと同様に試料中の蛍光分子をまばらに光らせるが、画像解析によって輝点の位置を決定するのではなく、STEDで用いたようなドーナツ型の励起光を用いて、能動的な探索を行う。励起光の形状と照射に対する蛍光分子の応答の仕方からその位置を速やかに決定する。これによって、高強度のレーザーや長時間の撮像を必要とせずに数nm程度の解像度を達成している。現状では非常に精密で高価な実験装置のセットアップが要求されるため研究に置いて普及された方法とはなっておらず、今後の技術革新によるユーザビリティの向上が待たれる。

7 蛍光性分子改良の取り組み

これまでに様々な光学顕微鏡の技術革新を見てきた。これに加え、観察の対象である蛍光性分子の改良によって顕微鏡の機能をサポートすることも試みられている。例として、SMLMを用いた超解像顕微鏡では試料中の蛍光分子をまばらに励起する必要があるが、自発的に明滅するように設計された蛍光分子を用いることで添加剤やレーザーを用いることなく簡便に超解像画像を取得することができるようになる⁸⁾⁹⁾。他にも、ターゲット酵素の存在下といった特定の条件を満たした場合のみ蛍光性を獲得する分子を用いることで、顕微鏡画像のコントラストを向上させること等が可能である¹⁰⁾。

文 献

- 1) E. Abbe : *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, **9**, 413 (1873).
- 2) S. W. Hell, J. Wichmann : *Opt. Lett.*, **19**, 780 (1994).
- 3) 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).
- 4) S. T. Hess, T. P. Girirajan, M. D. Mason : *Biophys. J.*, **91**, 4258 (2006).
- 5) M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang : *Nat. Methods*, **3**, 793 (2006).
- 6) M. G. Gustafsson : *J. Microsc.*, **198** 82 (2000).
- 7) F. Balzarotti, Y. Eilers, K. C. Gwosch, A. H. Gynnå, V. Westphal, F. D. Stefani, J. Elf, S. W. Hell : *Science*, **355**, 606 (2017).
- 8) M. Holtmannspötter, E. Wienbecker, T. Dellmann, I. Watrinet, A. J. Garcia-Sáez, K. Johnsson, R. Kurre, J. Pichler : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **62**, e202219050 (2023).
- 9) S. Uno, M. Kamiya, T. Yoshihara, K. Sugawara, K. Okabe, M. C. Tarhan, H. Fujita, T. Funatsu, Y. Okada, S. Tobita, Y. Urano : *Nature Chem.*, **6**, 681 (2014).
- 10) X. Wu, R. Wang, N. Kwon, H. Ma, J. Yoon : *Chem. Soc. Rev.*, **51**, 450 (2022).

[東京大学大学院薬学系研究科 橘 椋]