

光の回折限界を超える細胞機能イメージングの試み

根本 知己

自然科学研究機構 生理学研究所 脳機能計測・支援センター 多光子顕微鏡室

北海道大学 電子科学研究所 電子計測制御研究部門

JST CREST

1. 超解像技術の背景

近年の細胞生物学研究を加速的に進めた技術革新には、遺伝子工学的手法の確立とキット化というものの他に、蛍光顕微鏡を用いたイメージングも重要な寄与を与えたことは誰しも疑う余地はないであろう。特に、**green fluorescent protein (GFP)** とそれを用いた細胞内生体分子の蛍光タグ化によるイメージングのもたらした成果は極めて大きい。そしてその超解像化は細胞内の様々な生体分子の挙動について定量的な知見を与えている。ここで重要なことは、この蛍光イメージングにおける超解像化というものは、ただ単に超分子複合体や分子レベルで観察しました、ということではないということである。もした単に分子レベルの分解能を求めるのであれば、電子顕微鏡を用いれば良いことになってしまう。しかし電子顕微鏡においては生体試料を凍結、固定化し、場合によっては特殊な染色を行う必要がある。従って、生きた細胞内における複数個の生体分子や細胞内小器官などの動態のモニタリングには、それぞれ固有の波長の蛍光タグを付し観察する方法論が強力である。しかし、この蛍光タグ化技術単独では、電子顕微鏡に迫る分解能を得ることができないのもまた事実である。それ故に、生細胞中での超解像は生物系研究者の宿願なのである。

超解像 (**super-resolution**) という技術は、本来の顕微測定装置の持つ空間分解能を向上させるための技術である。これは主に光を用いたイメージングに対していわれるものであり、その光の持つ波動性のために本質的な限界—光の回折限界が空間分解能を規定している。一方で、デジタル的なセンサーの画素の物理的なサイズから制限される空間分解能を向上させる場合もまた、超解像と称されることもある。本稿において論述される対象である生物学的なサンプルにおいては、後者の「量子化」サイズは、本質的回折限界のサイズよりも十分に大きい。従って、通常のレーザー共焦点顕微鏡のように、固有の回折限界ぎりぎりまで、もしくはそれを超えたエイリアシングが出来た画像が取得できているシステムを対象に論を進めたい。

2. 「形態」分解能 vs 「情報」分解能～1 分子ナノ計測

光は波動としての性質と粒子としての性質を両方持ち、前者のために回折限界が存在する。すなわち、幾何光学的な立場からは光は無限小のサイズまで絞ることが可能であるが、その

波動性故に波長程度の有限な大きさまでしか絞ることができない。さらに、現実的には対物レンズの有限のサイズしか持ち得ない。この2つの性質は光を用いた計測において、高い空間周波数の情報が失われることを意味する。つまり、実空間で δ 関数の像が、観察装置を経て取得されたときにある幅を持った像として取得される。この関係を **point-spread function (PSF)** と呼ぶが、PSF の幅が空間分解能を決めることになる。この為、PSF の幅をどれだけ小さくさせるか、極論すれば、古典的な光学の教える回折限界よりも小さくできるかどうか、重要になる。また、このような議論では、「形態」的分解能と「情報」的分解能を厳密に区別して理解する必要がある。まとめると、「形態」的分解能の超解像化には PSF 分解能の向上と情報論的な高空間周波数の回復という2つのお互いに補完し合う方法論が存在する。後者においては明白な仮定が必要である。そして、それとは別に PSF 分解能の向上は必ずしも必要でないが、位置や大きさといった「情報」の空間分解能の超解像化が存在する。

3. 代表的な超解像蛍光顕微鏡法

① 非線形光学過程を用いた局所的照明 - 2光子顕微鏡

2光子励起過程は、1光子励起過程の吸収光子の1/2のエネルギーの光子2個の同時吸収により蛍光放出が可能な準位に遷移する過程であるので、その実現確率は光子密度の2乗に比例する。2光子励起過程では波長が2倍になっているため、2光子顕微鏡の空間分解能は共焦点顕微鏡に劣ることになる。しかし実際の使用上の問題はほとんどなく、生物標本に対する適用可能性が利する場合の方が多いと思われる。2光子顕微鏡は、励起レーザー光が近赤外領域にあるため、生体組織に対して低侵襲的である。そのため、生きた動物や患者さんなどの臨床的応用を考えれば、有力な将来性をもつ方法論である。そのために、レーザー装置やファイバー光学系の導入などの改良による、簡便化、普遍化が試みられている。

② エバネッセント場（近接場）を用いた超断層化-全反射顕微鏡

光が屈折率の異なる媒質の境界面に、高屈折側から低屈折側へ全反射を起こすような角度で入射した場合に、境界面から高屈折側の領域へ入射光はナノメートル程度の深さまで進入している。これがエバネッセント場である。この超局所的に存在する光を照明に用いることで、極めて高い断層性を得ることが可能である。生物顕微鏡において最もよく使われているのは、試料を保持するカバーガラス、スライドガラスと試料の存在する空間（水）との間の屈折率差を利用するもので、全反射（TIRF）顕微鏡としてオリンパス等から市販されている。また細胞膜と細胞質の間の屈折率差を利用し、細胞膜の近傍の分子や膜タンパク質に結合した蛍光分子のみを励起することも可能である。

③ 構造照明法

構造照明法では、空間的に細かい繰り返し構造を有する照明光で試料を励起することにより空間周波数の上限を増加させる。いわば「うなり」現象を使って標本の持つ高い空間成分

を抽出しようとするものである。実際には可干渉性を有する回折格子像をサンプルに照射し、その位置と光子パターンの角度を変化させて試料を撮影し、その像をコンピューター内で再構成することにより高い空間分解能を実現している。再構成のために計算時間が必要であり、しばしばその場で画像を得ることができないが、共焦点顕微鏡の2倍の空間分解能は得られると報告されている。

④ 2重ビームを用いた超局所励起法—RESOLFT法、特にSTED法

ドイツのStefan W Hell教授らのグループは、精力的に超解像イメージング法を推進している。最近、彼らの提唱するRESOLFT法が脚光を浴びている。この方法論は、回折限界を超える超局所的照明法の一つであるといえるが、その局所的な照明の実現方法がユニークである。この方法論では、分子の励起過程は通常の1光子励起過程を用いた方法論であり、一過的には、蛍光分子の励起は波動光学の教える回折限界で規定される波長程度の領域で生じる。しかし、その焦点位置よりも半波長程度離れた立体的な領域に存在する分子に、何らかの方法で蛍光放出を抑制させる。これにより、蛍光の放出可能な領域が対物レンズの焦点の極近傍に限定され、超解像イメージングが実現されている。この蛍光発生抑制には第2の光（ダーク光）を用いる。空間的な位相の変調により、焦点では強度が0となるようにする。実際の蛍光抑制に用いる光学的な過程として提案されているものは、誘導放出による蛍光放出の枯渇(stimulated emission depletion; STED)、基底状態の枯渇(ground state depletion; GSD)、フォトクロミズム、過飽和吸収である。これらの中で最も輝かしい報告を行っているのが、STED顕微鏡である。

4. 最後に

光学顕微鏡の空間分解能の向上の歴史は、生物科学における研究の進捗の原動力のひとつであった。色収差の低減した対物レンズが細胞内小器官の発見へと結びついた例をひもとくまでもない。また、分子生物学、遺伝子工学の進展が派手に見えていたこの数十年間においても、たゆまない努力がなされており、これらの両面の技術の相乗的な効果によって、「だれも見なかったもの」が白日の下へさらけ出されているといえる。これは自然の女神のベールの下を素顔を窺わんとする自然科学の行為そのものであろう。

尚、本稿は、拙作「光の回折限界を超える蛍光イメージング技術」（ぶんせき、日本分析化学会、vol. 409, No.1, pp.8-13, 2009）を参考に、生物物理若手の会夏の学校用に加筆、修正したものである。