

ecdysone. The results of our *in vivo* and *in vitro* experiments suggest that the defects in spatiotemporal caspase activation in the *βFTZ-F1* salivary gland *in vivo* are likely caused by the abnormal regulation of the ecdysone pulse generated in the ring gland. Thus, regulated synthesis and local exposure to ecdysone from the ring gland to the anteriormost part of the salivary gland are crucial to generate the unique caspase activation pattern in the salivary gland during metamorphosis.

Discussion

Our live-imaging experiments revealed three characteristics of caspase activation during salivary gland programmed cell death in wild-type controls *in vivo* (Figs. 1 and 2). First, the caspase activation was always initiated in only a few cells located in the anteriormost region of the salivary glands. Second, the caspase activation was propagated from the anterior cells to posterior cells of the salivary glands. Third, these spatial patterns of caspase activation were symmetrical along the median line. This anterior-to-posterior pattern could not be detected *in vitro* in cultured salivary glands (Fig. 3), suggesting that the sensitivity to ecdysone is equivalent among the gland cells. In contrast, local ecdysone stimulation from the anterior side induced anterior-to-posterior patterns of caspase activation *in vitro* likely to be observed *in vivo*. Therefore, we assume that a well organized system for ecdysone diffusion and transport from anterior side should form the spatiotemporal pattern of caspase activation in the salivary gland *in vivo*.

To determine the molecular mechanisms involved in caspase activation *in vivo*, we applied our live-imaging technique to mutants deficient in ecdysone-induced genes. *E93* is an ecdysone response gene that controls the expression of late genes, including the *Drosophila* caspase *dronc* (7, 20). An *E93* mutant showed strong inhibition of caspase activation, although the pupal-prepupal ecdysone pulse seemed to be normal (Fig. 4). These observations suggest that *E93* is an executor for caspase activation in the salivary gland programmed cell death through induction of late genes in the salivary gland.

Because the ecdysone pulse did not seem to be affected in the *E93* mutants, we hypothesized that the spatial pattern of caspase activation could be coordinated by the spatial distribution of the ecdysone pulse. Therefore, we examined caspase activation in *βFTZ-F1* mutants, in which a defect in adult head eversion suggests that the prepupal pulse of ecdysone is abnormal. In this mutant, caspase activation was inhibited or delayed, and in some cases it occurred in a random pattern in the salivary gland cells. There was no significant spatial pattern in these mutants, in contrast to the organized pattern seen in wild-type controls. Moreover, in these mutants, the symmetry of the spatial pattern of caspase activation had disappeared almost completely. The partial influence of *βFTZ-F1* on ecdysone response is likely because the alleles selected for this experiment were not nulls. However, the salivary glands from the *βFTZ-F1* mutant showed normal induction of caspase activity in response to ecdysone *in vitro*, suggesting that *βFTZ-F1* does not make a major contribution to cell death itself in the salivary gland. From these results, obtained by live imaging of *βFTZ-F1* mutant salivary glands both *in vivo* and *in vitro*, we hypothesized that *βFTZ-F1* regulates the ecdysone pulse in the ring gland where ecdysone is synthesized and secreted for salivary gland programmed cell death *in vivo*. The ring gland is located on the prothorax near the salivary glands, suggesting that the local activation of caspase may depend on the local interaction between the ring gland and salivary glands.

One possible mechanism for *βFTZ-F1* to regulate the ecdysone pulse involves its coordination of ecdysteroidogenesis by controlling the expression of downstream genes. *E75A* is a downstream gene of *βFTZ-F1* (21). The expression pattern of *E75A* is correlated with that of *βFTZ-F1* at 10 h APF (22). It has been hypothesized that *E75A* acts as a feedforward factor in ecdysteroidogenesis by enhancing the expression of steroidogenic enzymes (23, 24). Taken to-

gether, these observations suggest that *βFTZ-F1* may regulate ecdysteroidogenesis through regulation of *E75A* expression. Our current hypothesis is that a *βFTZ-F1*-*E75A* feedback loop in the ring gland results in the biosynthesis of precise levels of ecdysteroid, creating the spatiotemporal pattern of the ecdysone pulse and consequently of caspase activation in the salivary glands. At least in third-instar larvae, *βFTZ-F1* is expressed in the ring gland (24). However, the detailed function of *βFTZ-F1* in the ring gland remains to be elucidated. SCAT3-based live-imaging analysis will provide information regarding not only ecdysone-mediated biological events, including cell death, but also insight into the dynamics of ecdysone pulse.

Materials and Methods

Fly Stocks. The following fly strains were used in this work: *UAS-SCAT3* (25), *UAS-DRONC DNITM3* (26), *N393/Binsinscy* (16), and *sca-Gal4/CyO* (27). To generate the *E93* and *βFTZ-F1* mutants expressing SCAT3, *E93¹/TM6b*, *Df(3R)93F²/TM6b*, *βFTZ-F1¹²/TM6b*, and *βFTZ-F1¹⁹/TM6b* (27) were used. *Drosophila* crosses were carried out by standard procedures at 25°C.

Live Imaging of Caspase Activation in the Programmed Cell Death of Salivary Glands *in Vivo*. Live-imaging analysis of caspase activation *in vivo* with wide-field microscopy was performed as described in our previous reports with several modifications (15). Late third-instar larvae were selected from the appropriate crosses and monitored every 10–15 min for pupal formation. Each staged pupa was picked up and placed on a glass coverslip in a humid chamber to maintain viability. Animals were maintained at 23–26°C in a temperature-controlled room. Head eversion occurred ~11.5 h after puparium formation in wild-type controls (*N393/+*; *UAS-SCAT3/+*) in this culture system, consistent with a previous report (17). The optical system for *in vivo* live imaging was described in our previous report (15).

Detailed Spatiotemporal Pattern Analysis in Dissected Salivary Glands. After the beginning of caspase activation, as determined by *in vivo* imaging, the salivary glands from the observed pupa were dissected in ice-cold PBS within 15 min and fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C for 5 min. The salivary glands were placed immediately on coverslips. FRET images in fixed salivary glands were collected by confocal microscopy as described in our previous report (25).

Live Imaging of Caspase Activation During Programmed Cell Death in the Salivary Gland *in Vitro*. Confocal imaging analysis of caspase activation was performed as described in our previous report with several modifications (25). Salivary glands dissected at 8 h APF were cultured on glass coverslips in Schneider's *Drosophila* medium (Gibco, Grand Island, NY). Cultured salivary glands were maintained at 23–26°C in a temperature-controlled room. To protect the gland cells from damage, we preserved the interconnections between each salivary gland. After 50 μM ecdysone or ethanol (as a control) was added, confocal FRET images were acquired with the Aquacosmos/Ashura system (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) with a UPlanApo ×10 0.40 NA objective (Olympus, Tokyo, Japan) as described in our previous report (25).

In the case of local stimulation by ecdysone (Fig. 3B), salivary glands were cultured in 0.3% soft agarose-containing medium to obtain slow diffusion of ecdysone *in vitro*. The distance between the anteriormost cells of the salivary gland and the point of ecdysone injection was ~0.75 cm. We measured the diffusion of Alexa Fluor 488-maleimide dye to monitor the time for diffusion from anterior to posterior salivary gland cells. It was estimated to be ~60 min under these conditions (data not shown). The imaging analysis was performed with a ×4 0.16 N.A. objective (Olympus).

Mutant Imaging Analysis. The *E93* and *βFTZ-F1* mutants used in this work and their general defects in salivary gland cell death were described previously (6, 18, 19, 28). Controls (*N393/+; UAS-SCAT3/+*), *E93* [*N393/+; UAS-SCAT3/+; E93¹/Df(3R)93F²*], and *βFTZ-F1* (*N393/+; UAS-SCAT3/+; βFTZ-F1¹⁷/βFTZ-F1¹⁹*) mutants were used for SCAT3 imaging analysis *in vivo*.

We are grateful to H. Kanuka (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Japan), M. Kobayashi (National Institute of

Genetics, Mishima, Japan), E. H. Baeckreke (University of Maryland, College Park, MD), and H. Richardson (Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Australia) for materials and flies, and the Bloomington Stock Center for fly stocks. We are also grateful to T. Igaki, R. Niwa, and H. Ueda for valuable discussions. This work was supported by grants from the Japanese Ministry of Education, Science, Culture, and Technology (to M.M. and E.K.), the Cell Science Research Foundation, a RIKEN Bioarchitect Research Grant (to M.M.), and the Takeda Science Foundation (to E.K.). K.T. and A.T. are research fellows of the Japan Society for the Promotion of Science.

- Baeckreke EH (2000) *Cell Death Differ* 7:1057–1062.
- Thummel CS (1996) *Trends Genet* 12:306–310.
- Jiang C, Baeckreke EH, Thummel CS (1997) *Development (Cambridge, UK)* 124:4673–4683.
- Robertson CW (1936) *J Morphol* 59:351–399.
- Fristrom D, Fristrom JW (1993) in *The Development of Drosophila melanogaster*, eds Bate A, Arias A (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York), pp 843–897.
- Lee CY, Baeckreke EH (2001) *Development (Cambridge, UK)* 128:1443–1455.
- Lee CY, Simon CR, Woodard CT, Baeckreke EH (2002) *Dev Biol* 252:138–148.
- Hay BA, Guo M (2006) *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:623–650.
- Kanuka H, Sawamoto K, Inohara N, Matsuno K, Okano H, Miura M (1999) *Mol Cell* 4:757–769.
- Rodriguez A, Oliver H, Zou H, Chen P, Wang X, Abrams JM (1999) *Nat Cell Biol* 1:272–279.
- Zhou L, Song Z, Tittel J, Steller H (1999) *Mol Cell* 4:745–755.
- Daish TJ, Mills K, Kumar S (2004) *Dev Cell* 7:909–915.
- Mills K, Daish T, Harvey KF, Pfeleger CM, Hariharan IK, Kumar S (2006) *J Cell Biol* 172:809–815.
- Leulier F, Ribeiro PS, Palmer E, Tenev T, Takahashi K, Robertson D, Zachariou A, Pichaud F, Ueda R, Meier P (2006) *Cell Death Differ* 13:1663–1674.
- Takemoto K, Nagai T, Miyawaki A, Miura M (2003) *J Cell Biol* 160:235–243.
- Brand AH, Perrimon N (1993) *Development (Cambridge, UK)* 118:401–415.
- Ward RE, Reid P, Bashirullah A, D'Avino PP, Thummel CS (2003) *Dev Biol* 256:389–402.
- Broadus J, McCabe JR, Endrizzi B, Thummel CS, Woodard CT (1999) *Mol Cell* 3:143–149.
- Lee CY, Wendel DP, Reid P, Lam G, Thummel CS, Baeckreke EH (2000) *Mol Cell* 6:433–443.
- Daish TJ, Cakouros D, Kumar S (2003) *Cell Death Differ* 10:1348–1356.
- Woodard CT, Baeckreke EH, Thummel CS (1994) *Cell* 79:607–615.
- Sullivan AA, Thummel CS (2003) *Mol Endocrinol* 17:2125–2137.
- Bialecki M, Shilton A, Fichtenberg C, Segraves WA, Thummel CS (2002) *Dev Cell* 3:209–220.
- Parvy JP, Blais C, Bernard F, Warren JT, Petryk A, Gilbert LI, O'Connor MB, Dauphin-Villemanant C (2005) *Dev Biol* 282:84–94.
- Kanuka H, Kuranaga E, Takemoto K, Hiratou T, Okano H, Miura M (2005) *EMBO J* 24:3793–3806.
- Quinn LM, Dorstyn L, Mills K, Colussi PA, Chen P, Coombe M, Abrams J, Kumar S, Richardson H (2000) *J Biol Chem* 275:40416–40424.
- Reddy GV, Rodrigues V (1999) *Development (Cambridge, UK)* 126:2083–2092.
- Martin DN, Baeckreke EH (2004) *Development (Cambridge, UK)* 131:275–284.
- Thummel CS (2001) *Dev Cell* 1:453–465.

蛍光イメージング—最近の進歩：回折限界の壁を越える工夫—

永井健治*

はじめに

本特集は「空間」つまり形態学にその基礎を置いていた病理学に、生きた細胞を経時的に観察することで得られる「時間」軸の概念をプラスすることで、新たな病理学の方向性を見出そうという試みであるが、本稿では今一度「空間」に焦点を当て、従来不可能と言われていた回折限界の壁を越える「超解像」の最新知見を紹介する。

I. 共焦点顕微鏡の進歩

高い空間分解能での顕微鏡観察と言えば、まず共焦点蛍光顕微鏡を挙げないわけにはいかない。共焦点蛍光顕微鏡は、1957年にMIT (Massachusetts Institute of Technology) のMinskyが考案し、1980年代後半の実用化以降、多くの研究者に利用されている。通常の蛍光顕微鏡が励起光を試料全体に均一に照射(ケラー照明)し、試料全体から射出する蛍光を同時に観察するのに対し、共焦点顕微鏡は、回折限界まで絞り込んだスポット光で試料の1点のみを照明(クリティカル照明)し、その点から射出する蛍光を、対物レンズで集めて結像させる。この結像位置にピンホールを配置すれば、ピンホールに結像した光はそこを通過し、光電子増倍管 photomultiplier tube (PMT)などの検出器で蛍光強度が測定される。ピンホールに結像しない光、つまり試料面以外からの蛍光は遮断され検出器まで届かない。したがって、本方法を用いることにより、試料内の焦点からの光だけが選択的に検出されるわけである。試料自体か、あるいは励起用のスポット光を二次元に走査することで試料全体の蛍光像を観察することができるが、その試料全体の像は焦点面の

情報しか含まないため、ボケ像を排除した光学切片像となる。

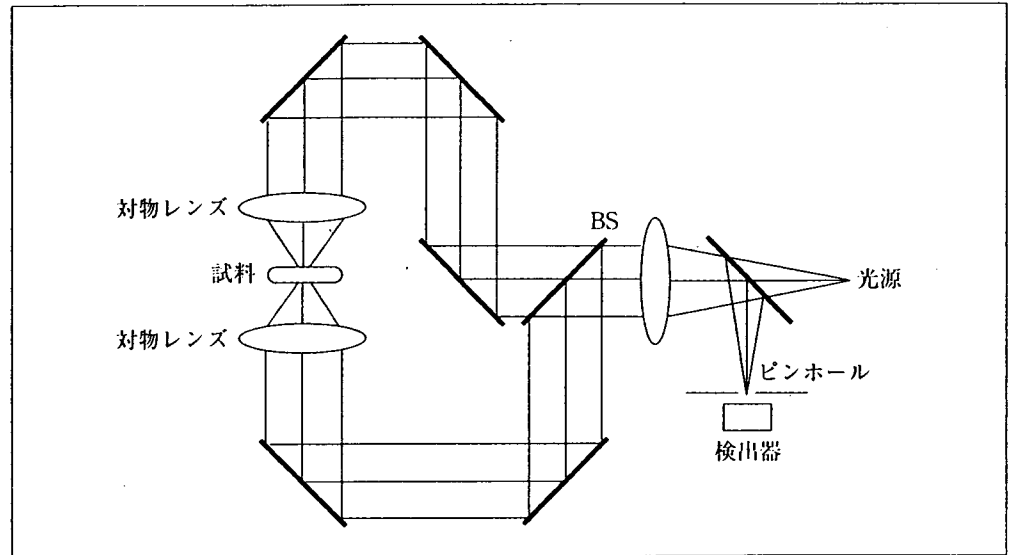
走査方法はガルバノミラーを用いた単点走査型が一般的であり、512×512の解像度で画像を1枚取得するのに1秒程度かかる。これではミリ秒スケールで起こる生理現象の観察はできない。そこで、空間分解能を犠牲にするぶん時間分解能を高める方式として、点ではなく線でレーザーを走査する共焦点顕微鏡が登場した。ZeissからリリースされているLSM 5 Liveである。点走査の場合x軸方向とy軸方向の2方向にレーザースポットを走査するが、LSM 5 Liveでは線状のレーザー光を1軸方向にのみ走査するため、512×512と同等の解像度の場合、最速120枚/秒の超高速画像取得が可能になった。

一方、線走査ではなく、点走査でも時間分解能を上げる方法がある。どうするのかというと、単点でなく多点で走査するのである。512×512の画像取得が1点走査で1秒かかるのであれば、1,000点を同時に走査すれば、1ミリ秒で画像取得ができるという理屈である。横河電機からリリースされているCSU (confocal scanner unit) は、ニポウディスクという“多数のピンホールが渦巻き状に配置された回転円板”を使用し、多点走査により共焦点画像を得ている。ガルバノミラーによる往復運動はウォブリングの発生のため、高速化には限界があるが、ニポウディスクは回転運動を利用しているため、高速化によるウォブリングの発生はない。例えば、CSU-X1は原理上2,000枚/秒という高速性を有しており、現時点では共焦点光学系のなかで最も高い時間分解能を有する。ただし、このように高速化すると、当然の帰結として、1枚の画像を取得する間に得られるシグナル(光子数)は減少し、したがって、S/N比の悪い画像にならざるをえない。もちろん、励起光強度を上げれば得られるシグナルは大きくなるが、蛍光分子の光褪色が無視できなくなってしまふ。

*北海道大学電子科学研究所ナノシステム生理学研究分野

図1 4 π 共焦点顕微鏡の光学系

光源から射出したレーザー光はビームスプリッター(BS)によって光路を2分割され、それぞれ試料の上下に設置された同一焦点をもつ対物レンズを通して、試料内にコヒーレントに絞り込まれる。試料からの蛍光信号は2つの対物レンズによって捉えられ検出器へ向かう。本図では励起・蛍光光学系の双方が4 π 光学系になっているが、どちらか一方のみの構成も存在する。



そこで必要になるのが超高感度受光素子である。近年、オンチップシグナル増幅が可能なEM-CCD (electron multiplying charge coupled device) カメラやHARP (high-gain avalanche rushing amorphous photoconductor) カメラが登場し、超高速共焦点画像取得を可能にした。後者はNHKが高感度なハイビジョン撮影のために開発したものである。中野らはこのHARPカメラとCSUの組み合わせに、さらにデコンボリューション演算を加えることで100 nmの空間分解能を達成した¹⁾。この顕微鏡を用いてGolgi体の動態を観察した結果、「Golgi体では1つの槽が網目状の構造をとりながらその中で違う性質の膜の融合と分離を繰り返し、次第に全体の性質を変えながら内部の蛋白を移動させていく」という、新しいメカニズムが働いていることを世界で初めて明らかにしている。

II. 4 π 共焦点顕微鏡

共焦点顕微鏡の空間分解能をさらに上げる工夫として、4 π 共焦点顕微鏡がHellとStelzerによって提案された²⁾ (図1)。これは試料を対物レンズで挟み、4 π ステラジアン(steradian)の立体角で励起光の照明と蛍光の観察を行うというものである。原理上、2倍の開口数になるため点像分布関数も狭小化され、したがって空間分解能が上昇する。2光子顕微鏡との組み合わせにより100 nmを上回る空間分解能を達成しているが、試料内での焦点面の移動、試料の交換、あるいは対物レンズの交換などがあると、光路長および焦点位置の再調整が必要となる。これらの微妙な調整が難しく普及が遅れている。

III. STED (stimulated emission depletion) 顕微鏡

これも共焦点顕微鏡の応用で、Hellによって開発された。4 π 顕微鏡が開口数の増加による空間分解能の上昇を狙ったのに対し、STED顕微鏡は試料面の蛍光分子が励起される範囲を極力小さくすることで空間分解能の上昇を達成している。従来の考えでは、回折限界以下に励起レーザーの絞り込みを行うことはできない。そこで、Hellらは励起レーザーを取り囲むような、ドーナツ状のレーザー照射を行うことを考案した³⁾ (図2)。このドーナツ状の光(STEDビーム)は、誘導放出のための光であり、励起状態にある蛍光分子が発光する前に、強制的に基底状態へと戻す働きがある。したがって、蛍光発光する分子がより局所に絞り込まれ、空間分解能が向上する。Hellらはこの顕微鏡により45 nmの空間分解能を達成し、シナプス小胞が開口放出した後もシナプトグミン分子がクラスターを形成し続けていることを見出した⁴⁾。この方法の利点はSTEDビームのためのレーザーが1本増えただけで原理的には通常の共焦点顕微鏡と変わらないことである。しかしながら、誘導放出させるためにGW/cm²という莫大なパワーのSTEDビームを照射する必要があり、蛍光分子のみならず、試料そのものへの光損傷が懸念されていた。

そこでHellらは光照射により蛍光状態が可逆的に変化する蛍光蛋白を利用すれば照射エネルギーを減少させることができるのではないかと考え、RESOLFT (reversible saturable optical fluorescence transitions) という方法を考案した⁵⁾。RESOLFTは莫大なエネルギー

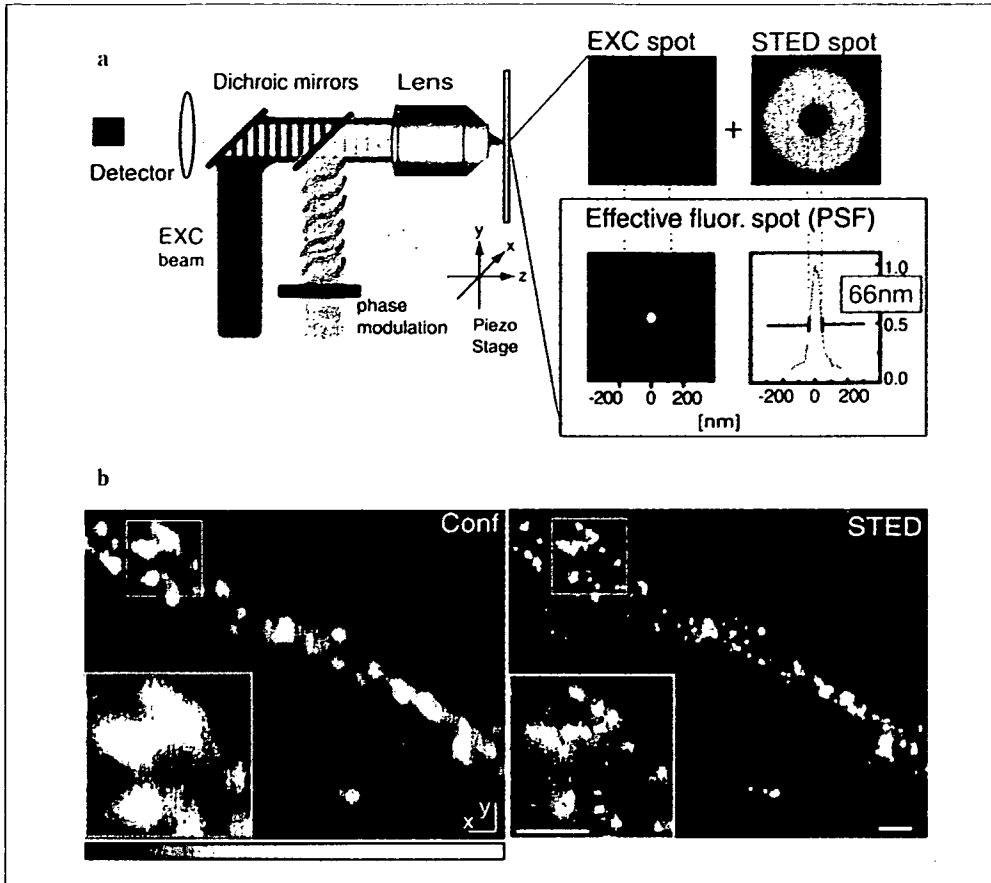


図2 STED顕微鏡の原理(a)と共焦点顕微鏡との比較(b) (文献4より)
 a: STED顕微鏡の光学系概略図。回折限界まで絞り込んだ励起レーザー光(青)とドーナツ形に成型されたSTEDビーム(オレンジ)が、蛍光試料に照射されると、STEDビームが照射されている部分の蛍光分子は強制的に基底状態へと遷移させられ、ドーナツの中心部分のみ蛍光を発することが可能になる(緑)。この領域は回折限界よりも小さく、66 nmの半値全幅をもつ鋭いピーク形状の蛍光スポットとなる。
 b: 従来の共焦点顕微鏡(左)とSTED顕微鏡(右)の比較。試料としてシナプトタグミンとAtto532で標識した二次抗体で染色した神経細胞を用いている。スケールバーは500 nm。

ギーを必要とする誘導放出の代わりに、少ない光エネルギーで蛍光のon/offを制御できることがポイントで、実に $1/10^8$ に照射エネルギーを減少させることに成功した。蛍光蛋白としてはLukyanovらが開発したasFP595を利用し、黄色光と青色でそれぞれ蛍光のonとoffを制御している。しかしながら、STEDにおける誘導放出が蛍光寿命よりも短いピコ秒オーダーで起こるのに対し、asFP595のダーク状態への変化はミリ秒レベルもかかることは大きな問題であり、今後の蛋白改変によって、より素早くon/offの移行を行う蛍光蛋白が登場することが必要であろう。あるいは、宮脇らが開発したDronpaがその特性上、有望かもしれない。Dronpaの解説は本特集の他稿(唐沢ら)を参照されたい。

IV. PALM(photoactivated localization microscopy)⁶⁾

この方法はPA-GFP(photoactivatable green fluorescence protein)やKaedeなどの光活性化型蛍光蛋白を発現した試料を全反射顕微鏡で1分子観察することを基本とする。したがって、撮像素子はEM-CCD

などの高感度カメラの使用が必須である。

この方法では、まず回折限界の領域内に存在する複数個の光活性化型蛍光蛋白のうち、1つだけを活性化できる程度の光強度で刺激光照射を行う。次に、輝点のシグナルを十分なS/N比が得られる程度の露光時間で取得し、最後に蛍光蛋白を光褪色する。これら3つのステップを、試料中の全ての蛍光分子が光褪色するまで繰り返し行う。画像取得後は1つひとつの輝点の強度分布からその重心位置を計算する。このようにして得られる空間分解能は10 nm程度であり、透過型電子顕微鏡像に肉迫する分解能が得られている(図3)。1分子計測法では1 nm程度の“位置精度”が得られることから、PALMにおいても将来1 nm程度の空間分解能が達成されるであろう。高い位置精度を巧みに利用して空間分解能の向上につなげている点が興味深い。ただし、1つの画像取得に2~12時間もかかるため、生細胞観察に応用することは不可能である。また、全反射顕微鏡を利用しているため、細胞深部の情報を得ることも困難である。画像取得中に試料の変形や顕微鏡ステージの熱ドリフトなどが起きないように工夫しなければならず、実用化はかなり難しい。

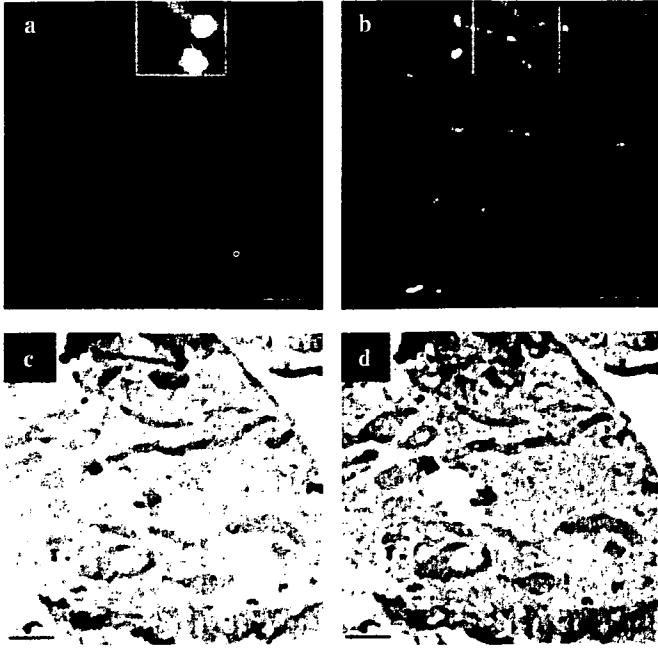


図3 通常の蛍光顕微鏡 (a) と PALM (b) の画像比較および透過電子顕微鏡像 (c) と PALM 像の重ね合わせ (d) (文献6より) チトクロームC オキシダーゼのミトコンドリア移行シグナルを連結した dEOSFP を発現させた Cos-7 細胞のクライオ超薄切片を作製し画像を取得。スケールバーは $1\mu\text{m}$ 。

V. structured illumination

規則正しい繰り返し模様を複数重ね合わせた時に、それらの周期のずれにより視覚的に発生する縞模様のことをモアレ縞と言う。例えば、図4のように2組の平行模様を斜めに重ねると交差部分が平行線の周期とは異なる、より粗い縞模様に見える。これがモアレ縞の代表的な例である。なぜモアレ縞が発生するのかというと、標本化におけるエイリアシングのためである。エイリアシングとは標本化周波数 W が、試料が有する周波数 W_m よりも小さい場合に、 $2W - W_m$ の折り返し周波数として観測されることがある。車が前方に走っているのにタイヤのホイールが逆回りしているように見える現象などに相当する。

さて、structured illumination 顕微鏡の原理は、試料中の見えない(空間分解できない)空間パターンを構造が既知の励起光を照射することで、見えるモアレ縞として可視化し、その縞パターンと励起光の照射パターンを基に、試料中の見えなかった構造を演算にて求めるというものである⁷⁾。Gstafsson は $0.23\mu\text{m}$ ピッチの楕円形パターンの励起光を試料に照射することで、 100nm 程度の空間分解能を達成し、アクチン線維を

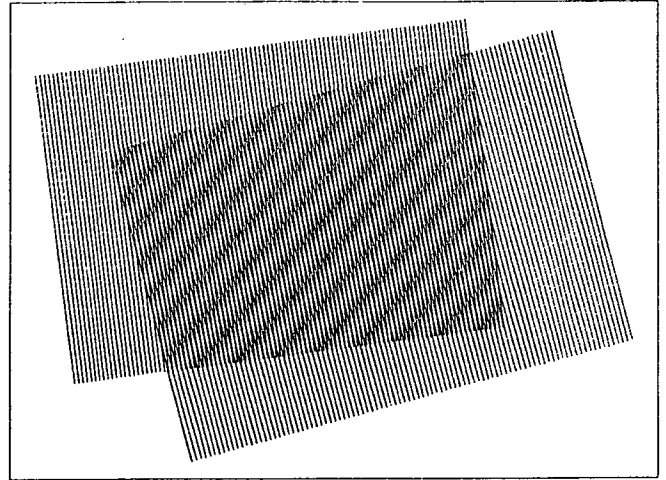


図4 モアレ縞

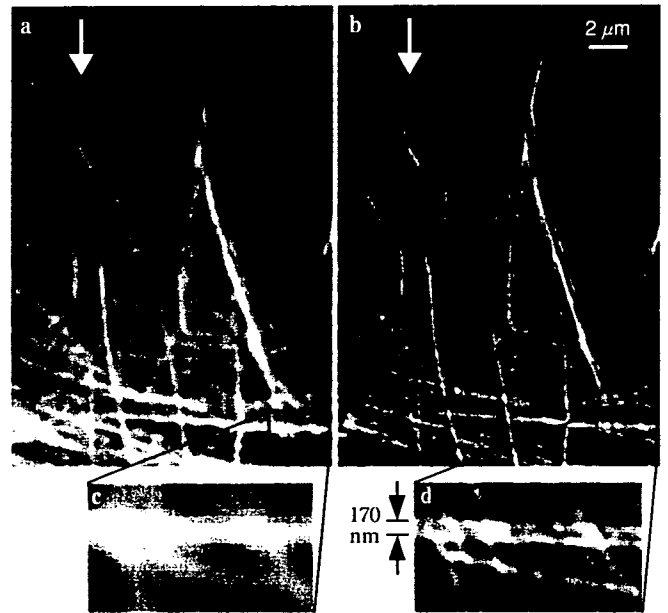


図5 通常の蛍光顕微鏡 (a, c) と structured illumination 顕微鏡 (b, d) の画像比較 (文献7より) ローダミンファロイジンで染色した HeLa 細胞のアクチン骨格を撮影。空間分解能以下の距離しか離れていないため通常の蛍光顕微鏡では分解できないアクチン線維 (c) が structured illumination 顕微鏡では分解されている (d)。矢印で示した最も細いアクチン線維の見かけの半値全幅は、通常の蛍光顕微鏡では $280\sim 300\text{nm}$ であるのに対し、structured illumination 顕微鏡では $110\sim 120\text{nm}$ となり、3倍程度、空間分解能が改善されている。

鮮明に画像化することに成功した(図5)。さらに彼は試料中の蛍光分子を全て吸収飽和状態にすることによる非線形効果を利用して、さらなる高分解能化を可能にする SSIM (saturated structured illumination microscopy) を提案している⁸⁾。蛍光分子が吸収可能な数を超える光を照射すると、蛍光分子はそれらの光を吸収することはできず、したがって励起光強度に対する蛍

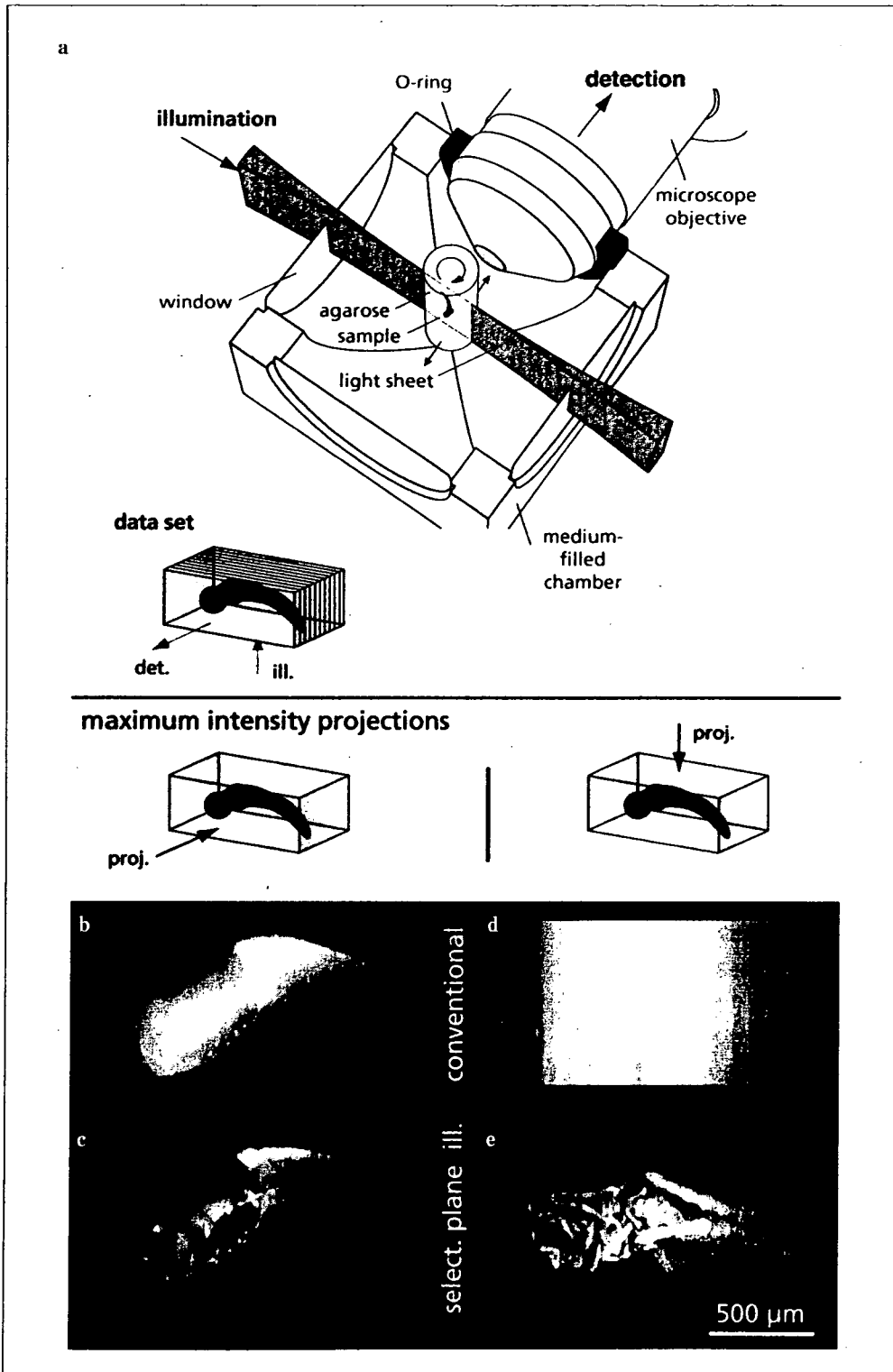


図6 SPIMの原理(a)およびSPIM(c, e)と共焦点顕微鏡(b, d)との比較(文献9より)

a: 筒状のアガロースに包埋された試料は、回転ステージの上に保持され、溶液で満たされたチャンバー内にセットされている。シート状の励起光は薄いガラス窓を通してチャンバー内に入り、試料を照明する。試料からの蛍光を捉える対物レンズはその光軸が励起光面に対し直角になるように配置され、先端部分は溶液の中に浸されている。

b~e: 照明方向を変えて撮影したメダカ胚。b, cは側面(左右軸)の、d, eは背腹軸に沿って撮影した複数枚の画像の投影図。b, dはシンドリカルレンズを利用せず均一に照明した時の画像。c, eは選択的な平面のみを照明して得た蛍光像。

光強度の線形応答がみられなくなる(非線形応答になる)。この非線形の応答には、周波数空間で考えると、励起光強度が高ければ高いほどより高周波の成分を含むことになるため、さらなる空間分解能向上が期待できる。実際、彼はSSIMにより50 nm弱の空間分解能

を達成しているが、生物試料の観察例はまだない。

問題点として、蛍光分子を全て吸収飽和させるための極めて強力な励起光を照射する必要がある。蛍光分子の光褪色や生体試料への光毒性が懸念される。光褪色が起こらない蛍光色素の登場が望まれる。

VI. SPIM (selected-plane illumination microscopy)

最後に、組織や発生過程の胚、三次元的な培養細胞を観察対象とする高分解蛍光顕微鏡を紹介したい。上述の4 π 顕微鏡をSTEDの発明者であるHellと共に開発したStelzerは、単一光線ではなく集束光面で試料を照らすことによって、生きた胚や細胞塊の三次元像が映し出され、従来法と比べて高い解像度と焦点深度を実現するSPIMを発明した⁹⁾(図6)。

従来の共焦点観察が集束レーザー光を利用するのは異なり、SPIMではシンドリカルレンズを利用して光が小さな“面”に集められ、対物レンズと直交する角度で試料に照射されるため、試料の“切片”像が得られる。目的とする“焦平面”のみが照らされるので、PMTのような点検出器ではなく、CCDカメラでシグナルを捉える。したがって、画像取得に必要な励起光照射時間が極めて短い。光源強度も低くなり試料の限られた部分のみに照射されることから、共焦点顕微鏡と比べ蛍光分子の光褪色が大幅に抑えられている。さらには、画像取得中に試料をCT撮影の時のごとく物理的に回転させることが可能である。この回転によって部分的に重複する像が多数得られ、コンピュータ処理により解像度の高い像を得ることができる。StelzerらはSPIMを用いて、メダカ胚の心臓のビデオレート観察や不透明なショウジョウバエの胚の発生過程を鮮明に映し出すことに成功した。通常の共焦点顕微鏡ではなしえないことである。

おわりに

ここで紹介した顕微鏡はいずれも蛍光顕微鏡である。利用している蛍光分子は全て可視光域に発光波長をもつものばかりである。従来の常識(アッペの回折限界理論)では可視光を用いると、せいぜい300 nm程度の空間分解能しか得られないとされてきた。ところが、ヒトの知恵というものは凄いもので、従来の常識を覆してしまった。人によっては「これは回折限界理論を打破したわけではない」と言われるかもしれな

い。が、そんなことはどうでもよい。画像が格段に鮮明になり、従来の顕微鏡では見えなかったものが見えるようになったのである。ここ数年の間に顕微鏡学の世界で地殻変動が起きることは間違いない。そして、そう遠くない将来、生きた細胞内における分子の構造や動態を分子レベルの空間分解能で観察できる日がくるであろう。そうなるに病理学にどれほどの影響を及ぼすのであろうか？非常に楽しみである。

文 献

- 1) Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A. et al. : Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* 2006, 441 : 1007-1010
- 2) Hell, S.W., Stelzer, E.H.K. : Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Opt Comm* 1992, 93 : 277-282
- 3) Hell, S.W., Wichmann, J. : Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 1994, 19 : 780-782
- 4) Willig, K.I., Rizzoli, S.O., Westphal, V. et al. : STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 2006, 440 : 935-939
- 5) Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S. et al. : Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102 : 17565-17569
- 6) Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R. et al. : Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 2006, 313 : 1642-1645
- 7) Gustafsson, M.G.L. : Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microscopy* 2000, 198 : 82-87
- 8) Gustafsson, M.G.L. : Nonlinear structured-illumination microscopy : Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102 : 13081-13086
- 9) Huisken, J., Swoger, J., Bene, F.D. et al. : Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 2004, 305 : 1007-1009

大口径ファイバー白色光源を用いた高速共焦点顕微鏡の開発と評価

齊藤 健太, 谷 知己, 小林健太郎, 永井 健治*

*北海道大学電子科学研究所

キーワード：バイオイメージング, 共焦点蛍光顕微鏡, スピニングディスク, アーク光源

1. はじめに

共焦点蛍光顕微鏡は通常の蛍光顕微鏡に比べて光軸方向に対して高い空間分解能を持つ。その特性を生かし、これまで細胞・組織内の分子局在について様々な知見が得られてきた¹⁾。また、近年の蛍光タンパク質技術の発展により、「生きたまま」の生物の「速い応答」、例えばCa²⁺濃度変化やタンパク質の局在変化を観察する需要が増し、共焦点顕微鏡には空間分解能を維持したままでの高速化(ビデオレート以上)が求められるようになってきた²⁾。一般的なガルバノミラーを利用した単点走査型の共焦点顕微鏡は、回折限界まで絞り込んだレーザー光を走査するという原理上、高いSN比を保って褪色なく高速化を実現する事は難しかった³⁾。スピニングディスクを利用したCSU(横河電機)は多点同時走査方式を採用することで高速化を実現した共焦点ユニットであり、光毒性や光褪色が少ない事も利点である。CSUは単点走査型のものと同様、蛍光色素の励起にはレーザー光源が用いられる。そのため励起波長の選択性は大きく制限されていた。これは現在開発されている様々な波長特性をもつ蛍光タンパク質の使用などを制限しており、実質的に特定のものしか使用ができない。しかしながら、原理的にはスピニングディスク方式のCSUにおいては、レーザー光源以外の光源を用いる事が可能である。そこで我々は、水銀またはキセノンアークランプを光源として用い、それを大口径ファイバーにカップルさせて、CSUに導入する事で励起波長の選択性を大きく改善する方法を開発した。さらにマルチカラーイメージングを行う際にハーフミラーを用いる事で400-700 nmまでの、いかなる波長範囲の蛍光色素を観察する場合においても、従来のようにダイクロイックミラーを交換したり、マルチクロイックミラーを用いることなく多色観察することを可能にした。

2. 白色光源 CSU 装置の構成

白色光源 CSU 装置を図1に示した。100 W (ワット) 水銀

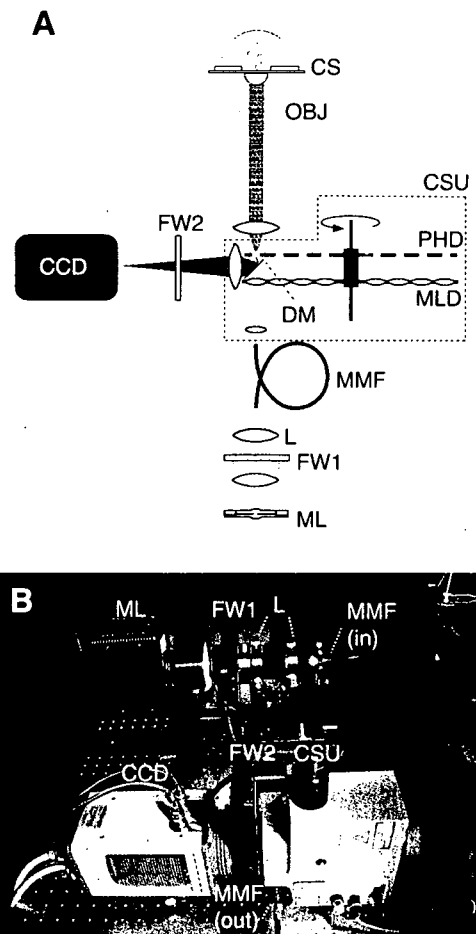


図1 (A) 白色光源 CSU 装置の概観図。ML: 100-W 水銀アークランプ, FW1: 励起用フィルタホイール, L: 集光用レンズ, MMF: マルチモードファイバー, DM: ダイクロイックミラー, CSU: CSU10, MLD: マイクロレンズアレイディスク, PHD: ピンホールアレイディスク, OBJ: 対物レンズ, CS: カバーガラス, FW2: 観察用フィルタホイール, CCD: 冷却 CCD カメラ。(B) 白色光源 CSU 装置の写真。

Kenta Saito, Tomomi Tani, Kentaro Kobayashi and Takeharu Nagai: A spinning-disc confocal microscopy for multi-color imaging using a mercury arch lamp as a light source

* 〒060-0812 北海道札幌市北区北12条西6丁目

* E-mail: tnagai@es.hokudai.ac.jp

2007年10月10日受付

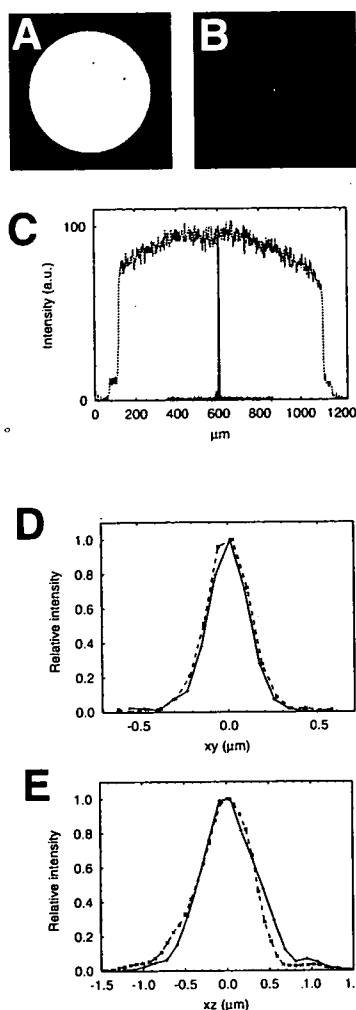


図2 白色光源CSU装置と従来のレーザー光源CSU装置の比較。(A, B) 白色光源のマルチモードファイバ端 (A) とレーザー光源のシングルモードファイバ端の画像 (B)。ファイバ端を対物レンズの焦点面に置き冷却 CCD カメラで画像を撮る事でこれらの画像を得た。(C) 得られた画像から解析したファイバ端の光強度プロファイル。それぞれの最大値を100に規格化してある。(D, E) 0.1 μm の蛍光ビーズを用いた白色光源CSU装置と従来のレーザー光源CSU装置の分解能比較。水平方向 (D) と垂直方向 (E) の蛍光ビーズの強度分布。

アークランプからの光はコレクターレンズによって直径1 mmのマルチモードファイバの入射端面に結像され導入される。従って、ファイバ入射端面ではアークランプの輝度分布を反映した不均一な面内輝度分布を示すが、ファイバ内を伝送する間に光がスクランブルされ、ファイバ射出端では、空間的に均一な点光源を得ることができる。この均一な光を、レーザー光源を利用する場合と同様、ファイバカップルによりCSUに導入した。導入された光は、レーザー光源を用いたCSUと同じく、マイクロレンズアレイディスク上に入射される。マイクロレンズを通った光は各々に対応するピンホール上に集光され、対物レンズを通して試料を励起する。試料からの蛍光は同じピンホールを通過して検出器 (冷却 CCD カメラ) に到達する。ただし、図1に

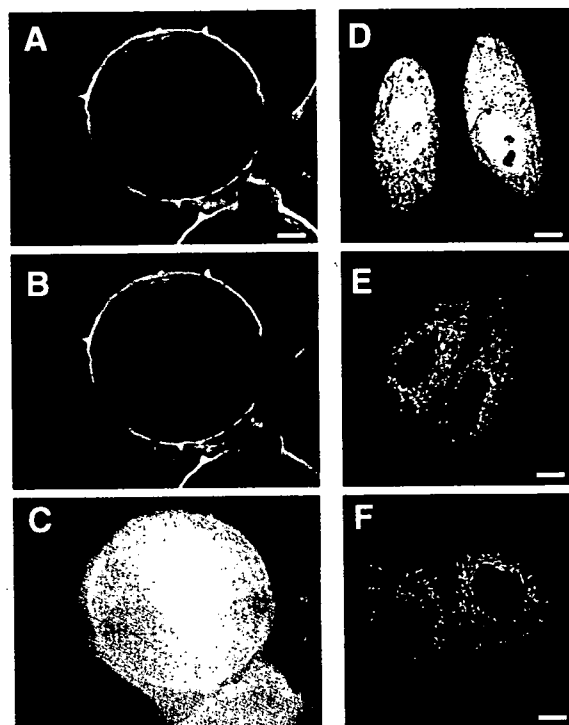


図3 白色光源CSU装置による生物試料の観察。(A-C) カボチャ花粉の白色光源 (A) およびレーザー光源 (B) CSUによる共焦点画像と非共焦点 (Wide-field) 画像 (C)。スケールバーは20 μm 。(D-F) ECFP単独 (D) と小胞体 (E)、ミトコンドリア (F) 局在化配列を融合した ECFP を発現した HeLa 細胞の蛍光像。スケールバーは10 μm 。

において以下の2点を簡略化して示している事に注意していただきたい；(1) 数個のレンズとそれに対応するピンホールのみを示しているが、実際にはディスク上には直径50 μm のピンホールが250 μm 間隔で約20,000個並んでいる；(2) 光線は1つのレンズ-ピンホールを通ったものだけを強調して示したが、実際にはディスク上に投影された直径2 cmの円内に含まれる全てのレンズ-ピンホールを光線が通過する。(3) ディスクが静止しているある瞬間を示しているが、実際にはCSU10では1,800回転/分、CSU22では1,500-5,000回転/分の速度で回転する。いずれのCSUにおいても30度の回転で1画像を形成するようにピンホールのパターンが設計されているため、CSU10、CSU22はそれぞれ最大360画像/秒、1,000画像/秒の画像取得が可能である。

3. 従来のレーザー光源CSUとの比較

従来のレーザー光源を用いたCSUと今回の水銀アーク光源CSU装置の比較をおこなった。始めに、アルゴンイオンレーザー (488 nm レーザーライン) のシングルモードファイバ射出端、水銀アーク光源 (450-490 nm, バンドパスフィルタにより波長選択) のマルチモードファイバ射出端の光強度分布を調べた (図2A, B)。アルゴンイオンレーザーにおいてはシングルモードファイバのコア系に相当する数マイクロメートルの光の点 (図2B) が、一本の鋭い強

度ピークとして観察された (図 2C)。一方、水銀アーク光源においてはマルチモードファイバーの射出端径に相当する直径 1 mm の均一な点が観察された (図 2A, C)。次に、空間分解能を比較するために直径 0.1 μm の蛍光ビーズ (TetraSpeck (Invitrogen)) を用いて点像分布の撮影を行った (図 2D, E)。xy 方向および xz 方向の半値全幅 (FWHM) は、レーザー光源の場合 0.28 μm (xy), 0.71 μm (xz), 水銀アーク光源の場合 0.25 μm (xy), 0.82 μm (xz) であった。ファイバー端での強度プロファイルが大きく異なっていたにも関わらず、結果的に空間分解能には全く差が見られなかった。

次にカボチャ花粉の自家蛍光をレーザー光源 CSU、水銀アーク光源 CSU 及び非共焦点 (Wide-field) において撮影し比較を行った (図 3A-C)。CSU で撮影した画像は Wide-field のものに対して高い空間分解を持つことは画像から明らかであった。一方、レーザー光源、水銀アーク光源による差は見られなかった。ECFP 単独およびミトコンドリア、小胞体局在配列を融合したタンパク質を Hela 細胞に発現させ白色光源 CSU で観察したところ、レーザー光源 CSU を用いて撮影

した場合と同様、空間分解能の高い画像を撮る事ができた (図 3D-F)。

4. 高速画像取得

元来 CSU はシングルモードファイバーから射出する開口数が 0.02 程度の発散角の少ない光源を利用することを前提に光学設計がなされている。ところが、マルチモードファイバーから射出する光は開口数が 0.1 程度と大きな発散角を持つため、CSU に導入した光のほとんどが利用されない。従って、励起光強度が不足し、CSU が得意とする高速画像取得が行えない可能性が考えられた。

そこで、EGFP を発現する培養細胞を水銀アーク光源 CSU 装置でビデオレート (30 Hz) 観察を試みた。CCD カメラとして背面照射型 EM-CCD カメラ (ImagEM : 浜松ホトニクス) を用いると、輝線の無い 480 nm 程度の励起光を利用した場合でも、高い S/N 比で観察することができた (データ未掲載)。さらに、EM-CCD に比べると感度が劣る 3CCD カメラ (浜松ホトニクス) を用いて、FRET の高速観察を検討

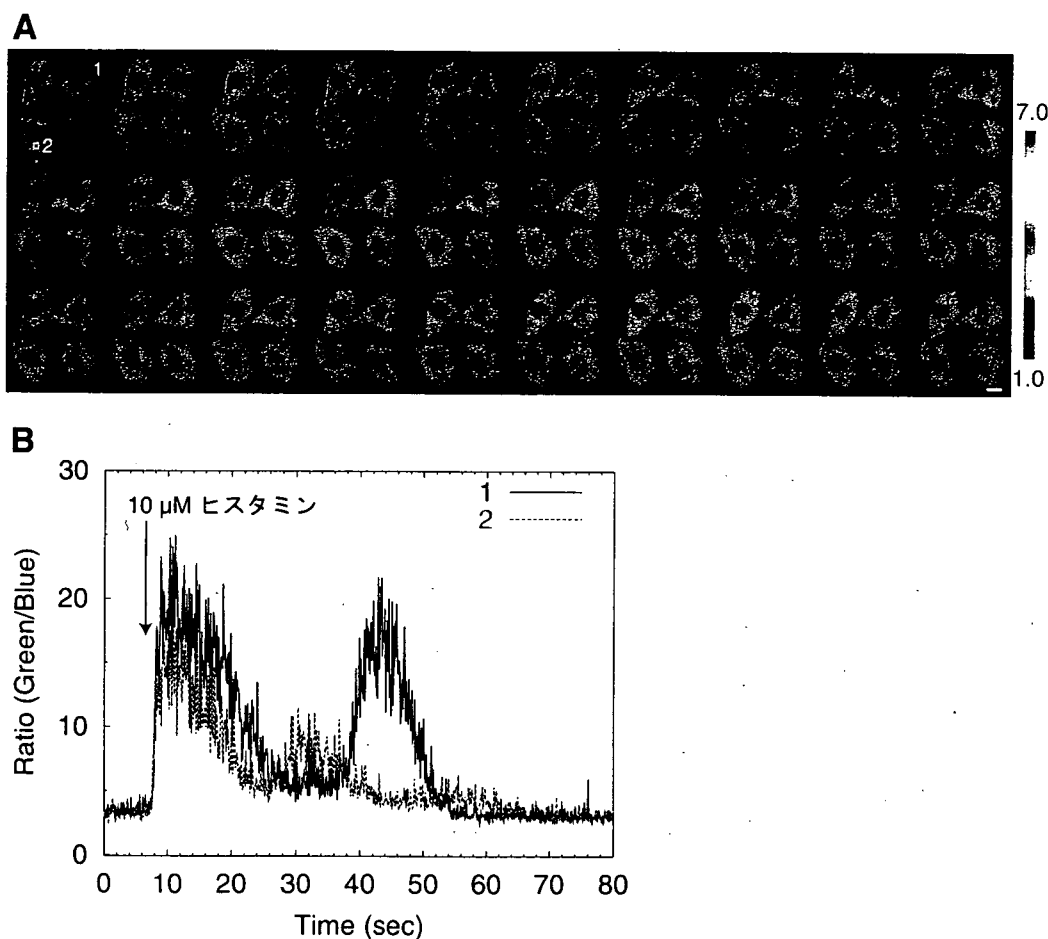


図 4 Ca^{2+} イメージング. (A) Yellow Cameleon (YC3.60) の FRET レシオイメージング. 3CCD カメラの緑チャンネル/青チャンネルのレシオ値を青色から赤色に割り付けて表示している. FRET が起きるとレシオ値が高くなるので、青色から赤色への変化は Ca^{2+} 濃度上昇を意味する. 連続画像はヒスタミン添加前後の Ca^{2+} 濃度が大きく変化する部分のみを表示している. スケールバーは 10 μm . フレーム間の時間間隔は 100 ミリ秒である. (B) A の一枚目の画像で示した ROI (1, 2) における時間的レシオ変化.

するため、CFPとYFP間のFRETを利用したCa²⁺指示薬であるYellow Cameleon (YC3.60)⁴¹を発現したHela細胞を10 Hzにて撮影した。その結果、細胞の端部からCa²⁺濃度上昇が起こり、細胞内に伝わっていく様子(図4A)やCa²⁺振動が見られた(図4B)。定量的な評価も水銀アーク光源CSU装置による観察により行なうことができた。以上の結果から、使用するCCDカメラの性能に依存はするが、水銀アーク光源を利用した場合でも10 Hz程度以上の高速観察が可能であることが示された。一方、これまでCSUをレーザー光源と組み合わせた従来の構成において、30 Hz(ビデオレート)以上で細胞内カルシウム伝播のイメージングが行われている⁵¹。前述した水銀アーク光源を利用した際のマルチモードファイバからCSUに導入された光の利用効率を改善する事でさらなる高速観察が可能になると考えられる。

5. ハーフミラーを用いたマルチカラーイメージング

CSUで多色の蛍光イメージングを行うためには通常はダイクロイックミラーを交換してイメージングを行うか、マルチクロイックミラーを使用する(例としてCSU用の3色マルチクロイックミラーの透過率を図5Aに示す)。しかし、ダイクロイックミラーの交換は各画像の撮影時間の不一致(タイムラグ)および重ね合わせの不一致(画素ずれ)という問題がある。また、マルチクロイックミラーは決まった色素の組み合わせしか使えず、にもかかわらず励起・蛍光特性が色素とマッチしない、かつ高価とデメリットが多い。そこで我々は400-700 nmの波長範囲で約50%の透過率を持つミラーをダイクロイックミラーの代わりとして使用した(図5B)。励起・観察用フィルタホイールから適切なフィルタの組み合わせを選ぶ事でマルチカラーイメージングが可能と

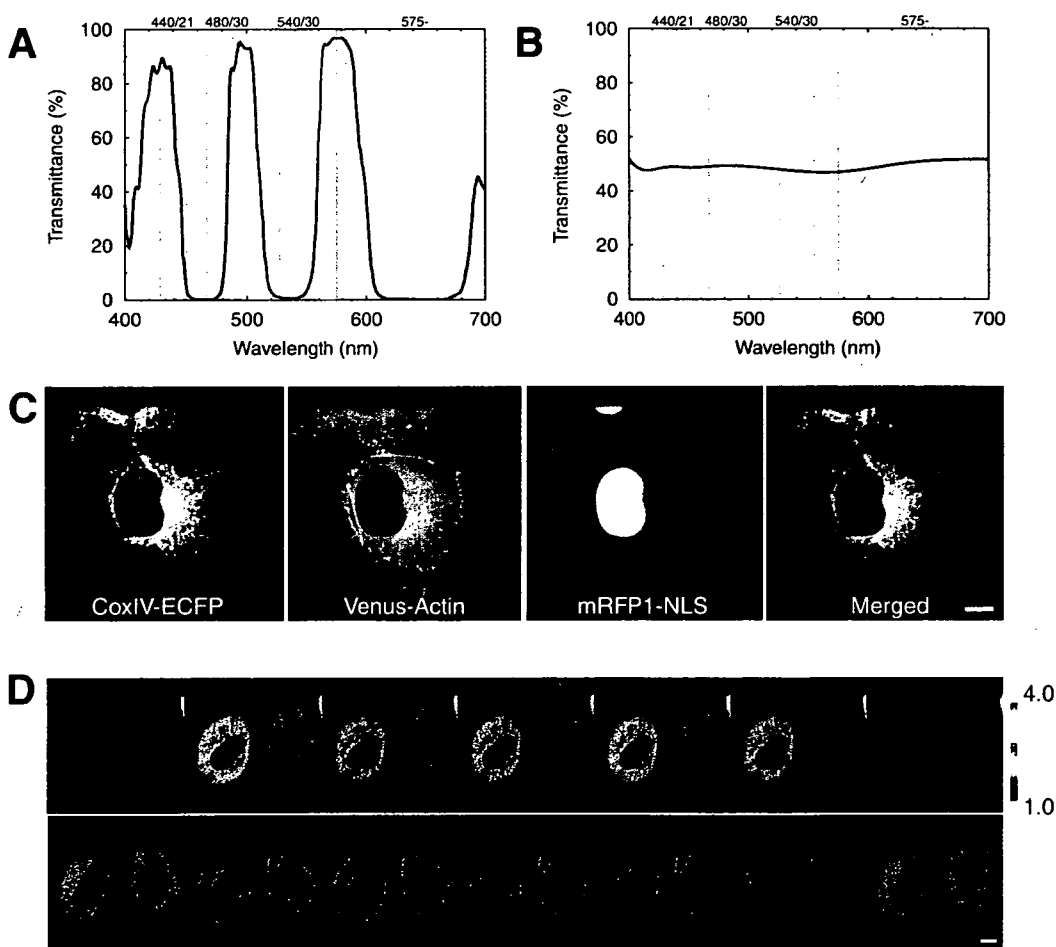


図5 白色光源CSU装置とハーフミラー併用によるマルチカラーイメージング。(A) CSUの3色用(CFP, YFP, RFP)マルチクロイックミラーの透過率曲線。(B) ハーフミラーの透過率曲線。400-700 nmにおいて約50%の透過率を持つ。水色、オレンジ色はそれぞれ観察に用いるCFP, RFPの励起フィルタ・蛍光フィルタの波長域を示している。(C) ECFP(ミトコンドリア), Venus(アクチン), mRFP1(細胞核)を共発現したHela細胞のそれぞれの蛍光画像と重ね合わせ画像。重ね合わせ画像はECFPを緑色, Venusを赤色, mRFP1を青色で示している。(D) YC3.60(上段)とPKC γ -DsRed T3(下段)を共発現したHela細胞のタイムラプスイメージング。YC3.60はYFPチャンネル/CFPチャンネルのレシオ値を青色から赤色に割り付けて表示している。青色から赤色への変化はCa²⁺濃度上昇を意味する。PKC γ -DsRed T3は蛍光強度を青色から赤色に割り付けて表示しPKC γ の移動が分かるように表示している。

なった。このハーフミラーを用いて ECFP (ミトコンドリア), Venus (アクチン), mRFP1 (細胞核) を発現した HeLa 細胞を撮影できた。観察時の励起・観察用フィルタの組み合わせは以下のとおり行った; ECFP: 励起 440/21 nm 蛍光 480/30 nm, Venus: 励起 490/20 nm 蛍光 535/26 nm, mRFP1: 励起 540/30 nm 蛍光 575 nm ロングパス。

次に我々は YC3.60 と PKC γ -DsRed T3⁶ を発現する HeLa 細胞を用い、3色蛍光タイムラプスイメージングを行った。ヒスタミン刺激に伴う Ca²⁺ 濃度の上昇 (図 5D 上段) と連動した、PKC γ の細胞膜への一過的移行と細胞質への再分布が観察された (図 5D 下段)⁷。

6. まとめ

CSU の利点をそのまま継承しつつ、水銀アーク光源とハーフミラーの併用によって蛍光色素の選択制限なく、同一細胞において複数波長の蛍光試料をタイムラプスイメージングする事が可能となった。光源は今回紹介した水銀アークラ

ンプに限らず、キセノンアークランプ、高輝度 LED 等が使えられ、2つの FRET 指示薬のタイムラプスイメージングや蛍光寿命の共焦点イメージング等、従来困難であった顕微観察への応用が期待される。

文 献

- 1) Goldman, R.D. and Spector, D.L. eds.: *Live Cell Imaging, A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2004)
- 2) Inoué, S. and Inoué, T.: *Methods Cell Biol.*, 70, 87 (2002)
- 3) Wang, E., Babbey, C.M. and Dunn, K.W.: *J. Microsc.*, 218, 148 (2005)
- 4) Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10554 (2004)
- 5) Genka, C., Ishida, H., Ichimori, K. et al.: *Cell Calcium*, 25, 199 (1999)
- 6) Bevis, B.J. and Benjamin, S.G.: *Nat. Biotechnol.*, 20, 83 (2002)
- 7) Sakai, N., Sakai, K., Ikegaki, N. et al.: *J. Cell Biol.*, 139, 1465 (1997)