

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)<sup>6)</sup>

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。

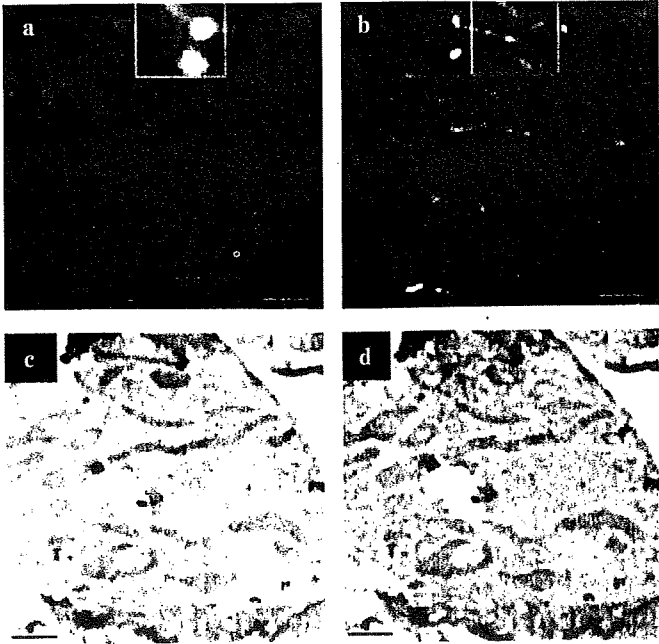


図3 通常の蛍光顕微鏡(a)とPALM(b)の画像比較および透過電子顕微鏡像(c)とPALM像の重ね合わせ(d) (文献6より) ナトクロームCオキシダーゼのミトコンドリア移行シグナルを連結したdEOSFPを発現させたCos-7細胞のクライオ超薄切片を作製し画像を取得。スケールバーは1 $\mu$ m。

## 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ところを言う。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<sup>7)</sup>。Gstafsson は0.23 $\mu$ 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、100 nm 程度の空間分解能を達成し、アクチン線維を

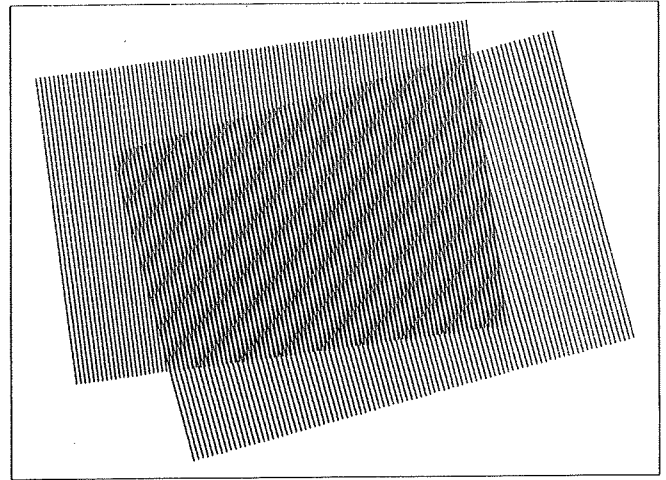


図4 モアレ縞

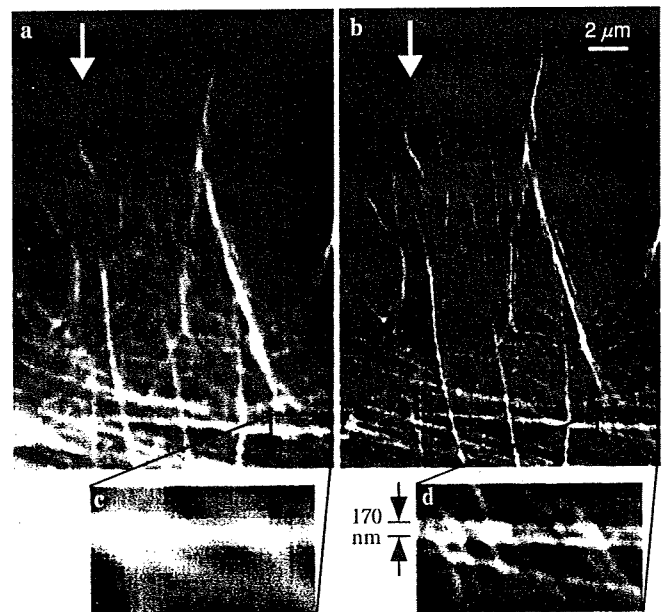


図5 通常の蛍光顕微鏡(a, c)とstructured illumination 顕微鏡(b, d)の画像比較(文献7より) ローダミンファロイジンで染色したHeLa細胞のアクチン骨格を撮影。空間分解能以下の距離しか離れていないため通常の蛍光顕微鏡では分解できないアクチン線維(c)がstructured illumination 顕微鏡では分解されている(d)。矢印で示した最も細いアクチン線維の見かけの半値全幅は、通常の蛍光顕微鏡が280~300 nmであるのに対し、structured illumination 顕微鏡では110~120 nmとなり、3倍程度、空間分解能が改善されている。

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<sup>8)</sup>。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

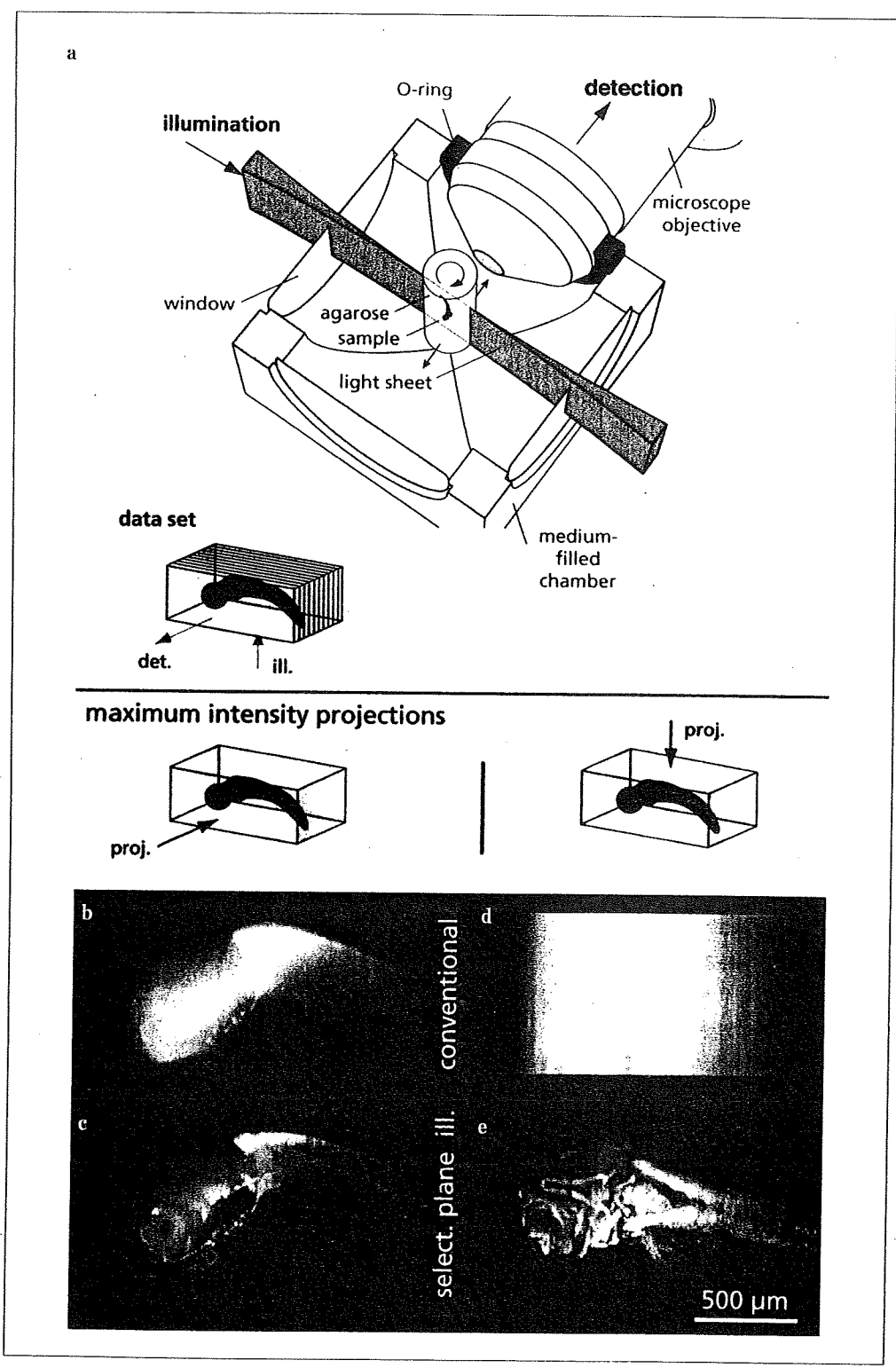


図6 SPIMの原理(a)およびSPIM(c, e)と共焦点顕微鏡(b, d)との比較(文献9より)

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り、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 $\pi$ 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<sup>9)</sup>(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門がくるであろう。そうなる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<sup>1)</sup>。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Ca<sup>2+</sup>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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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

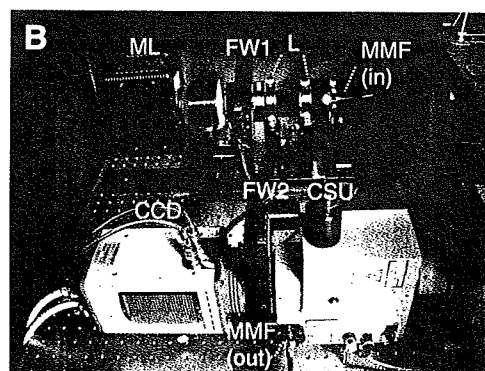
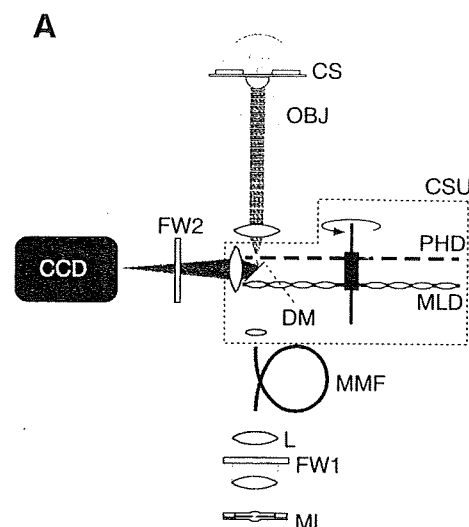


図1 (A) 白色光源 CSU 装置の概観図。ML: 100-W 水銀アークランプ, FW1: 励起用フィルタホイール, L: 集光用レンズ, MMF: マルチモードファイバ, DM: ダイクロイックミラー, CSU: CSU10, MLD: マイクロレンズアレイディスク, PHD: ピンホールアレイディスク, OBJ: 対物レンズ, CS: カバーガラス, FW2: 観察用フィルタホイール, CCD: 冷却 CCD カメラ。(B) 白色光源 CSU 装置の写真。

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

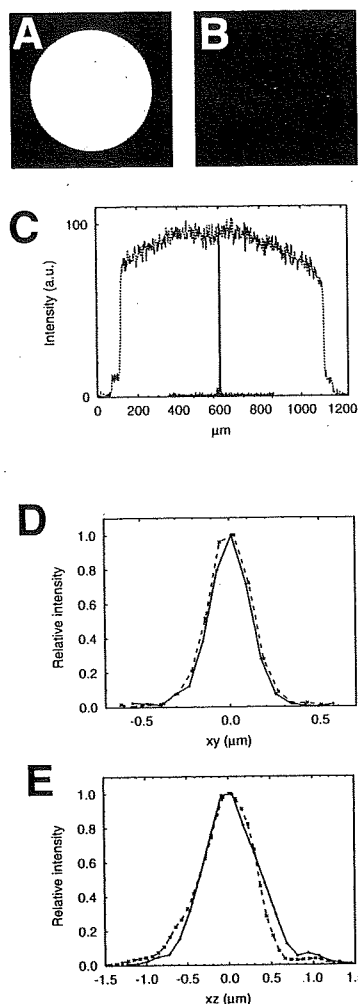


図2 白色光源 CSU 装置と従来のレーザー光源 CSU 装置の比較. (A, B) 白色光源のマルチモードファイバ端 (A) とレーザー光源のシングルモードファイバ端の画像 (B). ファイバ端を対物レンズの焦点面に置き冷却 CCD カメラで画像を撮る事でこれらの画像を得た. (C) 得られた画像から解析したファイバ端の光強度プロファイル. それぞれの最大値を 100 に規格化してある. (D, E)  $0.1 \mu\text{m}$  の蛍光ビーズを用いた白色光源 CSU 装置と従来のレーザー光源 CSU 装置の分解能比較. 水平方向 (D) と垂直方向 (E) の蛍光ビーズの強度分布.

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

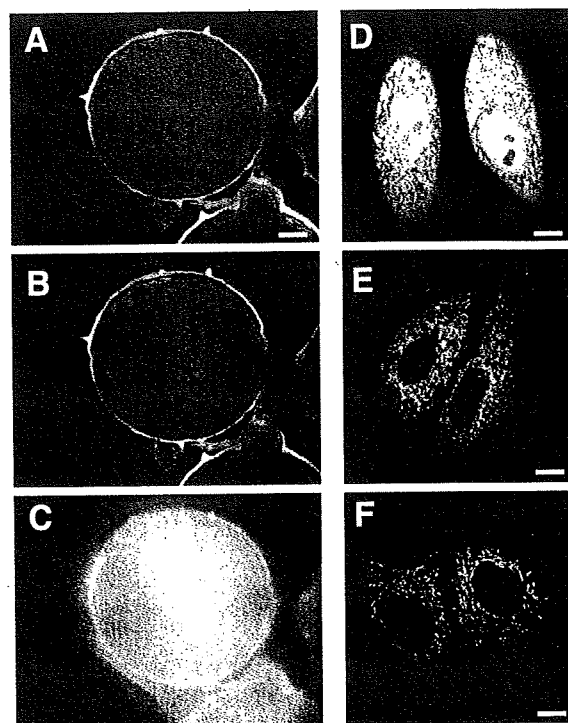


図3 白色光源 CSU 装置による生物試料の観察. (A-C) カボチャ花粉の白色光源 (A) およびレーザー光源 (B) CSU による共焦点画像と非共焦点 (Wide-field) 画像 (C). スケールバーは  $20 \mu\text{m}$ . (D-F) ECFP 単独 (D) と小胞体 (E), ミトコンドリア (F) 局在化配列を融合した ECFP を発現した HeLa 細胞の蛍光画像. スケールバーは  $10 \mu\text{m}$ .

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  $50 \mu\text{m}$  のピンホールが  $250 \mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  (xy), 0.71  $\mu\text{m}$  (xz), 水銀アーク光源の場合 0.25  $\mu\text{m}$  (xy), 0.82  $\mu\text{m}$  (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

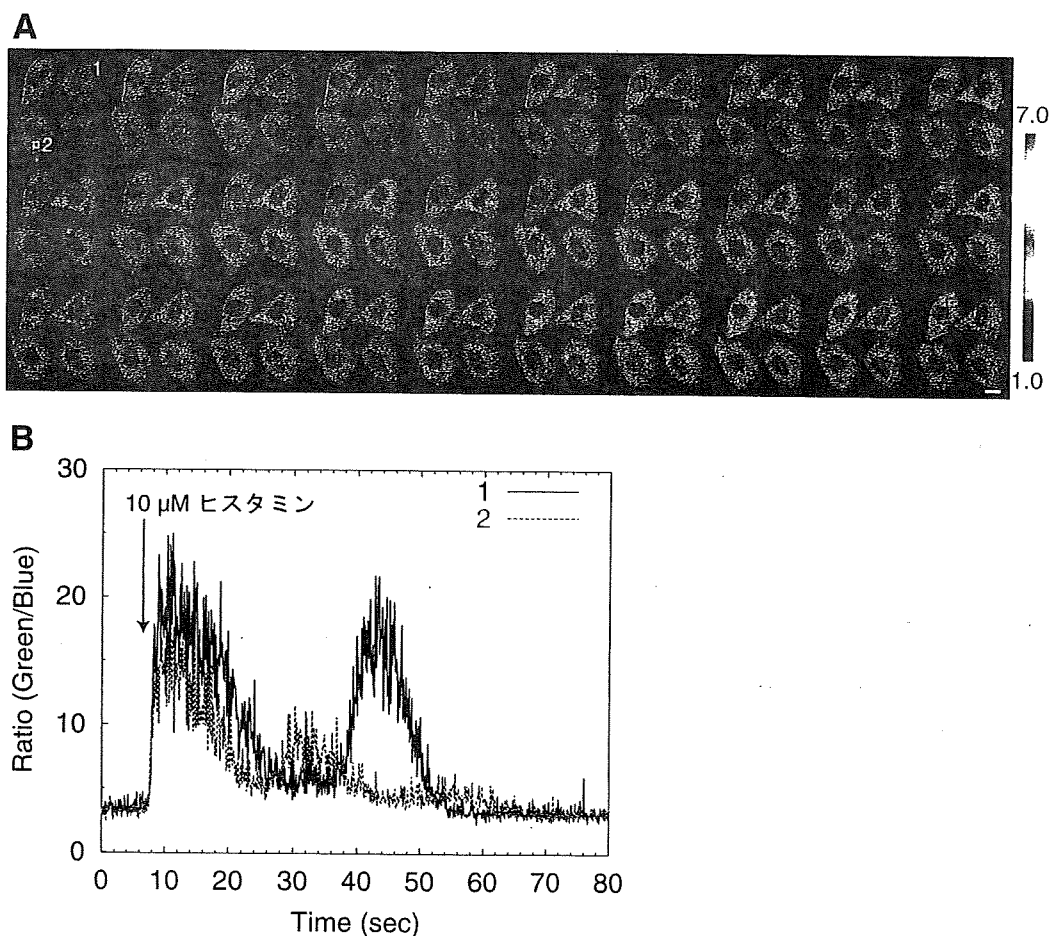


図 4  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング. (A) Yellow Cameleon (YC3.60) の FRET レシオイメージング. 3CCD カメラの緑チャンネル/青チャンネルのレシオ値を青色から赤色に割り付けて表示している. FRET が起きるとレシオ値が高くなるので, 青色から赤色への変化は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を意味する. 連続画像はヒスタミン添加前後の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が大きく変化する部分のみを表示している. スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ . フレーム間の時間間隔は 100 ミリ秒である. (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  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬である Yellow Cameleon (YC3.60)<sup>41</sup> 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  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が起こり、細胞内に伝わっていく様子 (図 4A) や  $\text{Ca}^{2+}$  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<sup>51</sup>。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

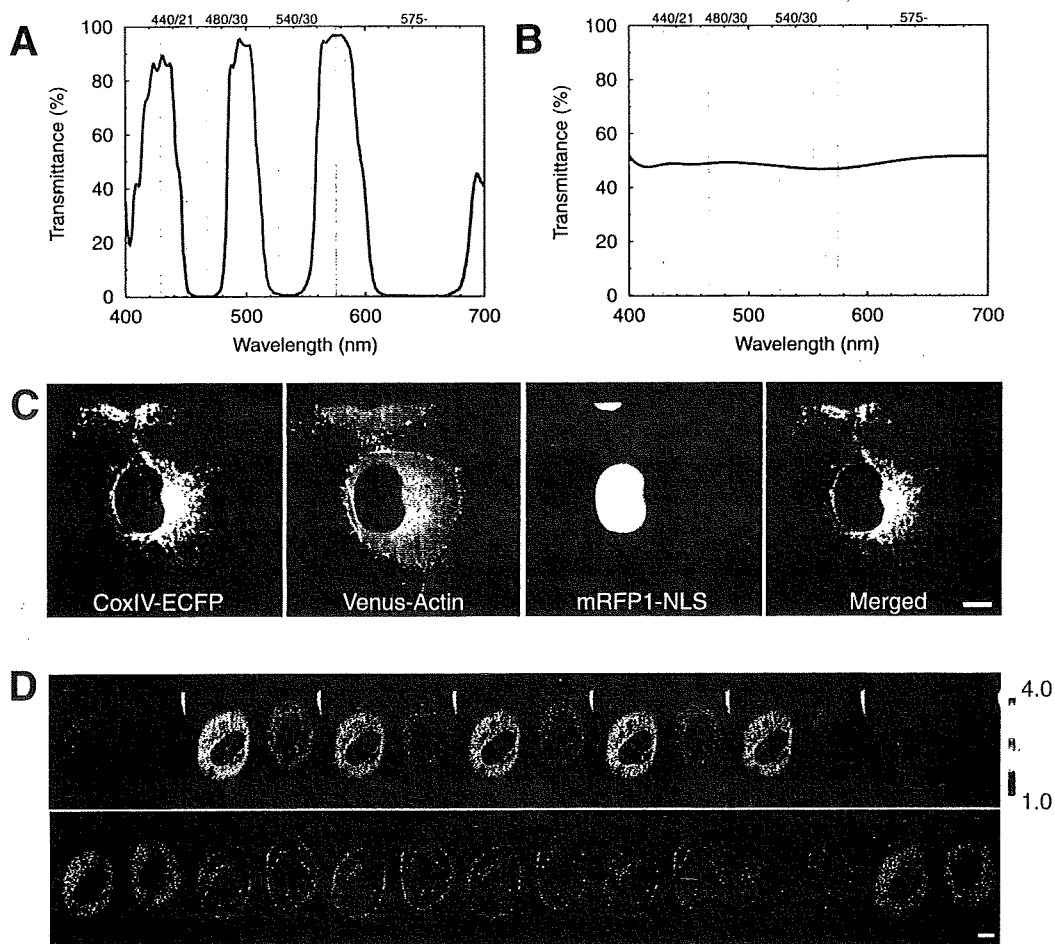


図5 白色光源 CSU 装置とハーフミラー併用によるマルチカラーイメージング。(A) CSU の 3 色用 (CFP, YFP, RFP) マルチクロイックミラーの透過率曲線。(B) ハーフミラーの透過率曲線。400-700 nm において約 50% の透過率を持つ。水色、オレンジ色はそれぞれ観察に用いる CFP, RFP の励起フィルタ・蛍光フィルタの波長域を示している。(C) ECFP (ミトコンドリア), Venus (アクチン), mRFP1 (細胞核) を共発現した Hela 細胞のそれぞれの蛍光画像と重ね合わせ画像。重ね合わせ画像は ECFP を緑色, Venus を赤色, mRFP1 を青色で示している。(D) YC3.60 (上段) と PKC $\gamma$ -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  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を意味する。PKC $\gamma$ -DsRed T3 は蛍光強度を青色から赤色に割り付けて表示し PKC $\gamma$  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 $\gamma$ -DsRed T3<sup>6</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇 (図 5D 上段) と連動した、PKC $\gamma$  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)<sup>7</sup>。

## 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)

THE UNIVERSITY OF  
PACIFIC

THE UNIVERSITY OF  
PACIFIC  
PACIFIC UNIVERSITY

THE UNIVERSITY OF  
PACIFIC

THE UNIVERSITY OF  
PACIFIC