

超解像顕微鏡の技術

徳永 和明（株式会社ニコンインステック・バイオサイエンス営業本部）

はじめに

光学顕微鏡では、光の回折による光学限界で約 200 nm という分解能の限界がある。近年、この光の回折限界を超えた分解能を持つ顕微鏡が開発され、超解像顕微鏡と呼ばれている。この超解像顕微鏡開発の功績が評価され、2014 年ノーベル化学賞を Eric Betzig 博士、Stefan W. Hell 博士、William E. Moerner 博士らが受賞した。ニコンは、構造化照明顕微鏡法（Structured illumination Microscopy = SIM）技術を用いた「N-SIM」、もうひとつは確率論的な再構築光学顕微鏡法（Stochastic Optical Reconstruction Microscopy = STORM）を採用した「N-STORM」の 2 種類の超解像顕微鏡を製品化し販売している。以下にそれらの技術について簡単に説明する。

(1) 構造化照明法 (N-SIM 図 1)

構造化照明法は、周期構造をもった「縞模様」を照射することにより、標本の微細構造との間で生じるモアレ現象を用いて、超解像画像を再構築する技術である¹⁾。SIM の解像度は、従来の光学顕微鏡の約 2 倍で XY 方向約 100 nm、さらに Z 軸方向も約 300 nm まで向上する。SIM の大きな特徴の一つとして、色素の制限がないことで、多色の 3D 標本を容易に観察できる (図 2)。

N-SIM は、1 画像を最速 0.6 秒で取得できることから、ライブセルイメージングへの適応も可能である。これまでに N-SIM を用いて、細胞内小器官の形態観察、動態観察、また従来の顕微鏡では分離できないタンパク質局在の詳細な位置関係などの解析が報告されている。

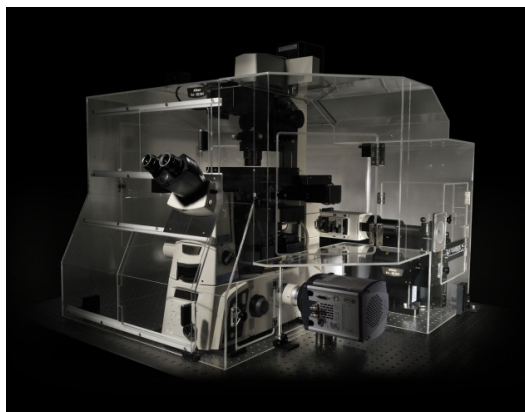


図 1 超解像顕微鏡 N-SIM の装置外観

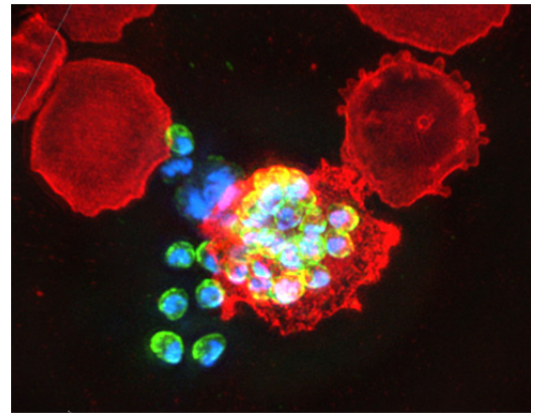


図 2 マラリア原虫が寄生した赤血球

マラリア原虫膜 (MTIP) を Alexa Fluor® 488, 赤血球 (Band3) を Alexa Fluor® 568, DNA を DAPI で標識

(2) ローカリゼーション法 (N-STORM 図 3)

ローカリゼーション法とは、離散的に分子を光らせて、その中心位置を高精度に検出した画像を重ね合わせる事によって、高分解能の画像を構築する技術である²⁾。この方法では、従来の光学顕微鏡の約 10 倍程度の XY 方向約 20 nm、Z 方向 50 nm の分解能を得ることができる。

従来の N-STORM では、数千枚～数万枚の画像取得に数分かかるため、固定標本が解析の対象であった。最新超解像顕微鏡 N-STORM 4.0 は、照明系の改良及びカメラ撮像スピードを 500 枚/秒に向上させることにより、画像取得時間が大幅に短縮し、生きた標本の超解像画像取得が可能となった (図 4)。さらに、「Wide-view」モードにより、撮影エリアがこれまでの 4 倍に拡大し、広範囲な視野における超解像観察も可能となった (図 5)。



図 3 超解像顕微鏡 N-STORM 4.0 の装置外観

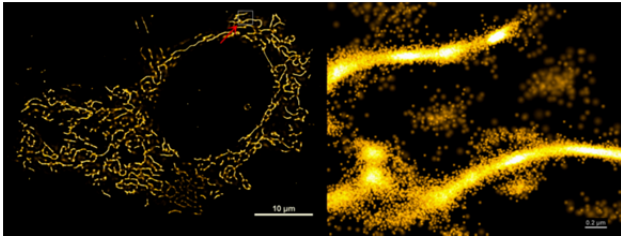


図4 ミトコンドリアの動態解析

BSC1細胞のミトコンドリアをMito Tracker® Redで標識。取得速度：1分間隔のタイムラプスで30分間撮影。弊社HPにて動画紹介

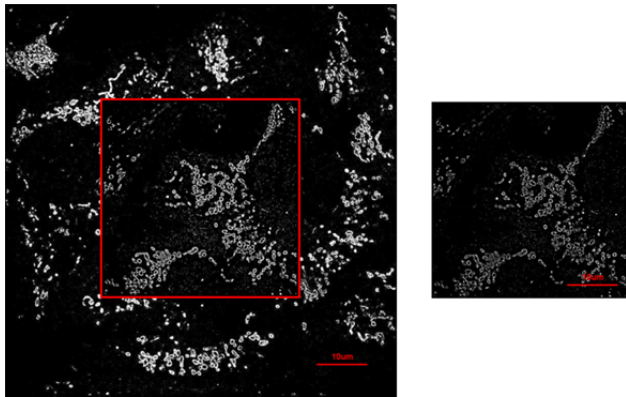


図5 STORM 4.0 「Wide-view」モード

左画像：撮像エリアが従来機の4倍に拡大した。
右画像：従来機の撮像エリア。HeLa細胞のミトコンドリアTom20をAlexa Fluor® 647標識

(3) その他関連技術 (NIS Elements C-ER)

超解像顕微鏡は、これまでの光学顕微鏡では解析できなかった微細構造やダイナミクスを捉えることが可能となった。一方、組織のように厚みのある標本では超解像顕微鏡での観察が困難である。ニコンでは、高感度のディテクターと独自の画像処理アルゴリズムにより、共焦点レーザー顕微鏡の分解能を高めたNIS Elements C-ERを開発した。画像取得後にNIS Elements C-ERソフトで処理することにより、XY方向約160 nm、Z方向300 nmの分解能を得ることができる(図6)。

おわりに

超解像顕微鏡という技術が実際に製品として使えるようになった今後は、多くの研究者にお使いいただき、研究の発展に寄与していくことができれば幸いである。

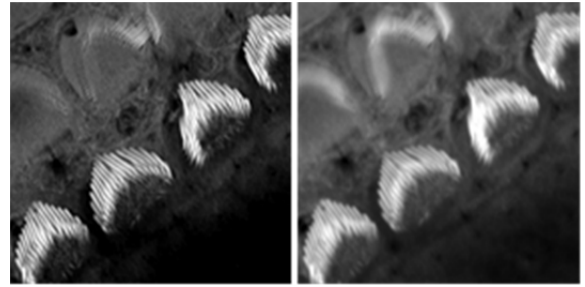


図6 NIS ELEMENTS C-ER 画像

左画像：NIS ELEMENTS C-ER 画像。右画像：共焦点(1AU)の比較。内耳有毛細胞のアクチンをAtto-565-phalloidinで標識

画像ご提供

図2：愛媛大学 プロテオサイエンスセンター

森田将之先生，高島英造先生，飯村忠浩先生，
坪井敬文先生

図6：神戸大学大学院医学研究科 分子細胞生物学分野

富樫英先生

参考文献

- 1) Gustafsson, M. G. L. (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy* **198**: 82–87.
- 2) Rust, M. J., Bates, M. and Zhuang, X. (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods* **3**: 793–796.

以下のサイトにて製品や技術，サンプル動画などをご紹介します。

・超解像顕微鏡 N-SIM

<http://www.nikon-instruments.jp/jpn/bioscience-products/super-resolution/n-sim/index.html>

・超解像顕微鏡 N-STORM 4.0

<http://www.nikon-instruments.jp/jpn/bioscience-products/super-resolution/n-storm/index.html>

株式会社 **ニコン** インステック

バイオサイエンス営業本部

<http://www.nikon-instruments.jp>