

光子を巧みに用いて ナノスコープを向上させる

SPIE フォトニクス・ウェスト2018の期間中、3つある生体医学光学シンポジウム (BiOS) の総会のひとつにおいて、独マックス・プランク研究所 (Max Planck Institute) のシュテファン・ヘル氏 (Stefan Hell) は、遠視野の光学超分解能顕微鏡法 (別称、蛍光ナノスコープ法) の新たな可能性となるコンセプトについて議論した。ヘル氏は言うまでもなく、2014年ノーベル化学賞の受賞者の一人である。新たなコンセプトである MINFIELD⁽¹⁾、MINFLUX⁽²⁾、DyMIN⁽³⁾ は、超分解能技術が分子分解能に到達するまでの障壁を克服するよう設計されたものだ。

ヘル氏の功績で知られる誘導放出抑制 (STED) 蛍光顕微鏡法は、分子放射をサブ回折サイズの領域に限定するドーナツ状の光ビームを用いて分子の蛍光を連続的にオフ (またはオン) にすることで、隣接する分子を識別できる。この手法の発見は興奮すべきものだったが、標本の光褪色を早めてしまうために制約があった。

STEDでは、光活性のあるプローブを連続的にスイッチングさせる他の超分解能法と同様、光強度がしきい値に届くか超えるときに分子は蛍光を発生 (または発生せず)、光強度が低いところでは反対の状態になる。蛍光から非蛍光状態に分子がスイッチするとき (またはその逆) には、しきい値を超える強度パターンの最大値を必要とする。その最大値は分解能と相関し、サブ回折スケールでは必要とする光強度が大きくなる。最高分解能に到達することは、高い光強度を意味する。イメージ作成

では、分子が蛍光能を失うまで、最大強度で標本中の各分子を露光させる。低い光強度で分子が識別できるほど離れているところでは、高い光強度は必要ない。

そこで、新たなコンセプトが生まれつつある。

より狭く走査する

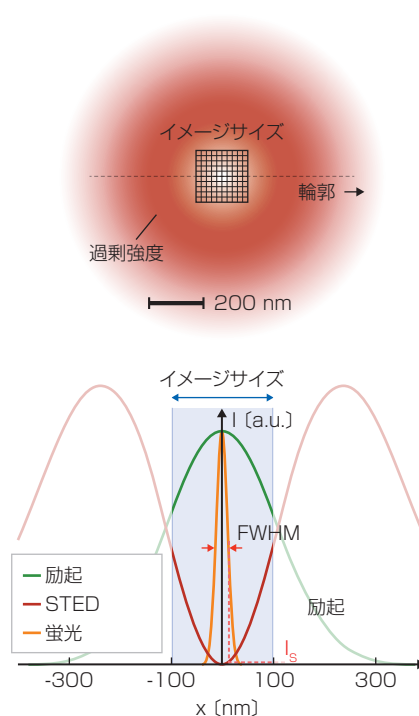
ドーナツの頂点部分にあたる高い光強度は蛍光スイッチングに必要なという事実を利用するのが MINFIELDだ。その名の通り、MINFIELDは、サブ回折サイズ領域の走査を制限することで、蛍光能の損失を軽減させる (図)。スイッチングに必要な低強度のみに分子を露光させることで、MINFIELDは強度の高い有害な状態への遷移を大きく避ける。

ヘル氏らのチームは、光褪色を100倍軽減したことを示した。そして、従来の走査では十分なシグナルを得ることができなかった条件で、細部の分解能を25nm以下にできた。シグナルが強いほど記録時間も速くなるため、MINFIELD-STEDが生命科学アプリケーションの新ラインになりえると予測されている。

最小の光子束

連続的なスイッチングによって隣接する分子を識別できるものの、空間的な配置はわからない。これは超分解能イメージングに必要なもう1つの要素である。

超分解能イメージング技術は、空間的配置をどのように同定するかという意味で2つの立場に分かれる。STEDのような座標目標アプローチと可逆的飽和・

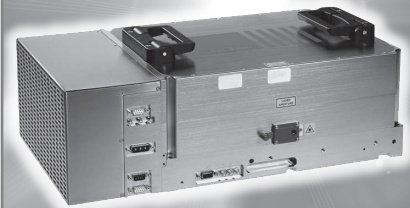


ドーナツ状のSTEDの焦点ビームは、中心で焦点領域から強い光を排除させることで、エリア内のみが分子が蛍光を発生する。しかし、最大光度が強いため標本は光褪色を起こし、STEDビームの波長の半分以上に光が分散する。MINFIELDは、回折限界以下のエリア (ドーナツの中心あたり) に視野像を制限する。ここでは、ビーム強度はより抑えられている。そのため、より高い分解能で蛍光シグナルを取得でき、光褪色も大きく抑えられる。(提供: マックス・プランク研究所)

高エネルギー
フェムト秒レーザー

Onefive ORIGAMI XP

High Energy Femto-second Laser



特徴

- ▶ 超コンパクトな All-in-one デザイン
- ▶ 空冷 / 水冷 (オプション)
- ▶ あらゆる方向にマウント可能
- ▶ リアルタイム・パルスエネルギー測定制御
- ▶ バーストモード
- ▶ 高いパルス品質
- ▶ メンテナンスフリー

主なアプリケーション

- 高精密レーザー手術
- マイクロマシーニング
- プラズマ発生
- 非線形オプティクス
- LIBS
- THz 発生 等

<https://www.japanlaser.jp/>

E-mail: nkt@japanlaser.jp



本社 〒169-0051 東京都新宿区西早稲田2-14-1
TEL: 03-5285-0863 (直)

大阪支店 TEL: 06-6323-7286
名古屋支店 TEL: 052-205-9711

切替性光学蛍光遷移 (RE-SOLFT) では、光パターンの最小強度の位置を制御する機器によって放射位置を特定できる。もう1つの方法として、光活性化局在性顕微鏡法 (PALM) と確率的光学再構築顕微鏡法 (STORM) のようなアプローチでは、蛍光回折パターンの重心を検出するカメラを用いて放射位置を推定する。重心ベースの方法では約5nmの正確性が示唆されるが、さまざまな因子がこの目標を困難なものにしている。

MINFLUXは、分子と(最小の)放射束を組み合わせたというコンセプトだ。

MINFLUXはPALMとSTORMと同様、蛍光分子の確率的なスイッチングに依存するが、STEDのようにドーナツ状の励起ビームを使用して放射体を位置付ける。局所的な最小強度の励起光を用いて放射体を探索する。最小放射点を見つけることで、ナノスケープ法に必要な光子数を減少させる。1nmオーダーの精度達して6nmの分解能を得るために必要な蛍光光子の数を22分の1以下にできると研究者は報告している。

1分子トラッキングのために、MINFLUXは空間分解能と1トレースあたりの局在化の数を100倍向上させた。理論上の限界には到達していないため、このモダリティが「生きた細胞やそれ以外におけるマイクロ分子のダイナミクス、分布、構造を観察する新境地を切り開くだろう」と研究者は期待している。

適応照明

MINFIELDがSTEDやRESOFLTなどの座標目標アプローチをサポートするために設計されたように、標本の完全な状態をさらに維持するようなコンセプトを一般化して拡張するものが

動的強度最小 (DyMIN) だ。これは、希望する分解能で特定の構造的特徴をイメージするために適切な光になるよう、動的に適応する。

回折限界以上に隣接する2つの蛍光分子を識別したいとしよう。DyMINは蛍光分子からのある距離において、共焦点の分解能で走査を始める。ガウス励起スポットの側面が蛍光分子に到達するにつれ、検出されるシグナルは増大する。DyMINは、蛍光分子が「オフ」となり、分解能を高めるのに十分な光となるよう強める。蛍光分子が別の走査位置で再度放射すると、照明が再び増大する。STEDビームが目標の分解能に一致し、2つの蛍光分子が分かれて存在するよう見えるまで再度実行する。DyMINはその後、蛍光分子が密集していないエリアに移動するにつれて強度を弱める。

各ピクセルまたはボクセルをイメージするごとに光強度を調整することで、DyMINは蛍光分子が見つかったときに準分解能で「隣接している」として蛍光を記録する。そして、隣接サイズと、イメージングした構造をマッチングさせる。研究者は、DyMINは一般的なバイオイメージングの条件における走査領域で光量を約20分の1、2Dと3Dサンプルで100分の1以下に低下できると示している。光褪色のリスクが低くなるだけでなく、シグナル、コントラスト、分解能が向上するという利点も含まれている。より明るいイメージを30nm以下の分解能で得ることができる。(Barbara Gefvert)

参考文献

- (1) F. Göttfert et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 114, 2125-2130 (2017).
- (2) F. Balzarott et al., Science, 355, 606-612 (2017).
- (3) J. Heine et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 114, 37, 9797-9802 (2017).