黄色CW OPSLの利用によって進歩するSTED技術を用いた超解像顕微鏡

アルフ・ホニグマン、クリスチャン・エゲリング、マティアス・シュルツェ、アルノー・レペルト

低ノイズの577nm連続波（CW）光励起半導体レーザ（OPSL）によって、研究者たちは青色/緑色蛍光体を使用して、かつてない解像度で細胞の構造と膜動力学をイメージングすることができるようになった。

研究者たちは、生物学上の主要な疑問に答えるには回折限界を越える光学顕微鏡を押し進める必要があると考え、誘導放出抑制（STED）がこの目的を達成しうる蛍光イメージング法であることを証明した[1]。最初は超高速パルスレーザを使って実証が行われていたが、CWレーザの利用によってSTEDはかなり簡素化され、実装コストも低減された[2]。ゲート制御された検出スキームとの組み合わせは、試料に照射するレーザパワーを大幅に低減し、生細胞イメージングにおける細胞の光損傷を最小化する役割を果たした[3]。

本論文では、生物学的に重要とされるスペクトル領域で最も低い出力ノイズを提供するCW、577nm OPSLのSTED効果に対する最初の適応結果について報告する。例として、細胞膜内のナノスケールの分子運動や相互作用の観察を可能にするSTEDと蛍光相関分光法（FCS）の組み合わせに対するこのシステムの利用についても考察した[4]。

STEDナノ顕微鏡法

現在、生物学者たちは分子の挙動を巨視的挙動に結び付ける努力をしている。例えば、どのように細胞が互いに信号を送っているか、その際に、どのようにして細胞／生命体レベルの信号が逆に単一遺伝子を調節するDNA／RNAレベルの制御に中継されるのかを決定するといったことである。これは可能な限り高い空間分解能と実時間で動的なサブ細胞イベントを追跡するに十分な時間分解能で化学、活動度、構造を結び付けることを意味している。

蛍光顕微鏡法は、色素、標識、または蛍光タグを付けた遺伝子生成物が特定の分子またはイオン（例えばCa^{2+}）の位置と運動をマッピングするなどして、この重要な研究の多くを支えている。しかし、光学顕微鏡法の空間分解能は回折によって光源波長の約1/2の詳細レベルに制限されている。

多光子励起、構造化照明、4π顕微鏡法などの技術は、この回折限界によって生じる空間分解能の壁をその絶対限界にまで押しやったが、この壁を真に壊すことも、無制限な分解能を提供する

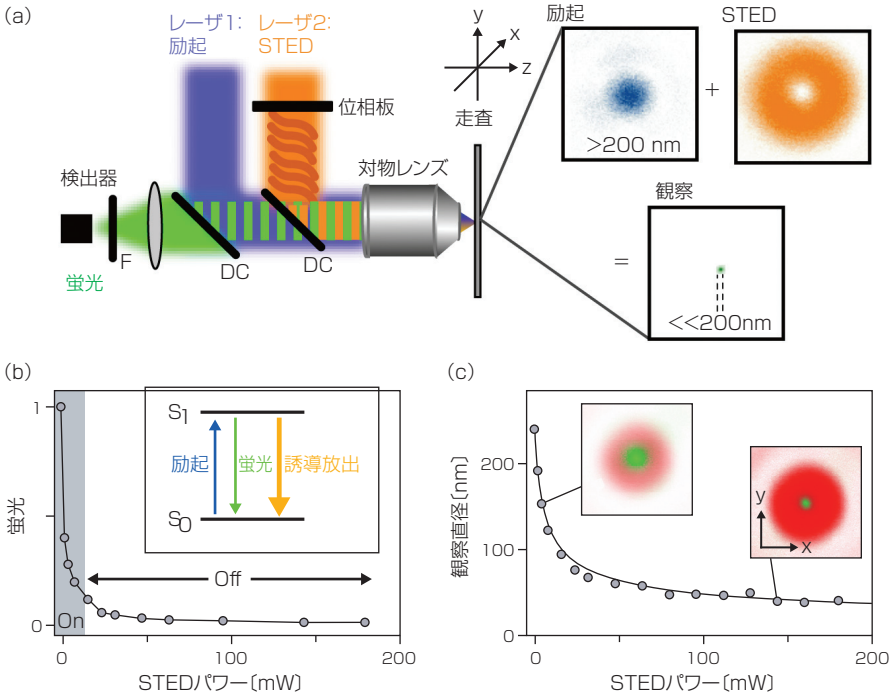

図1　STEDの原理。（a）位相板、対物レンズダイクロイックミラー（DC）、蛍光フィルタ（F）、検出器、走査装置、励起とSTEDレーザなどからなるSTED ナノスコープのセットアップの概略図と、それらの焦点強度分布（右）と代表的なサブ回折サイズの観察エリアを示した。（b）STEDナノスコピーは、励起S_1状態からS_0基底状態への脱励起によって誘導放出蛍光放射を抑制することに基づく。蛍光体をスイッチオフする確率はSTEDパワーの増加とともに増加した。（c）このパワー依存性はサブ回折サイズの観察体積を提供する。いぜんとして蛍光放射が可能な体積（緑、挿入図）はSTEDレーザパワーの増加につれて減少する。

こともできていない。STED顕微鏡法は、原理的に無制限の空間分解能で3D画像を生成することができ、広範囲の適用性と速度を持つ最初のアプローチとして登場した[1]。結果として、STEDはナノスケールの生物学的イベントをリアルタイムで調べる実験に実際に利用されるであろう。さらに重要なことは、今や、STEDはライブセルにおけるこれらの研究を可能にする潜在能力を示している。

STED技術

STEDナノスコープは2本のレーザビームを使う。1つ目は励起レーザであり、これは、通常、共焦点顕微鏡のように蛍光標識された試料内の回折限界に近いスポットに集光される。このレーザの励起波長はターゲットの蛍光体の吸収ピークと一致するように選択される。

共焦点顕微鏡では、アパーチャを使用して、光検出器が集光ビームと一致する*x-y-z*点で励起された蛍光だけを「見る」ようにしている。その際3D画像はこのスポットを連続する*z*軸方向の深度で*x-y*ラスタ走査することで構築されている。

STEDでは、共焦点アパーチャではなく、2つ目（STED）のレーザビームと励起レーザを重ねることによって、分子が検出される*x-y-z*体積を定義する。特に位相マスクが1つないし、暗（0強度）中心をもつドーナツ形のビームで焦点強度分布を生成するために使われている（**図1**）。STEDレーザ波長は励起レーザの波長よりも長い波長にその中心をもっており、誘導放出による蛍光体の励起状態を抑制する。

一定の閾値よりも十分に高いSTEDレーザパワーを適用すると、STEDビーム光路内で励起された蛍光はすべてSTED波長を放射してしまうため、（自然）蛍光として利用することはできない。結果として、1つ目のレーザで励起された蛍光はSTEDドーナツの中央の暗いホールにだけ存在することができる。蛍光抑制が回折限界より小さなサンプリング領域で定義するために使用される理由は、レーザ強度の依存性から導き出されている。すなわち、STEDレーザ強度を誘導放出された蛍光の抑制閾値に対して高くすると、蛍光が許容され続ける領域（すなわち蛍光検出でサンプリングされる領域）が効果的に縮小されるためである。

セットアップと位相マスクの依存によってSTEDは*x-y*面または3つの全空間（*x-y-z*）軸におけるサンプリング量を減少させることができる[1]。 そのとき、2Dまたは3D画像は、共焦点顕微鏡と同様に、試料を横切って試料体積を走査することによって構成される。すでに言及したように、蛍光量の減少、すなわち画像から得た空間分解能は原理的に無限大となっている。これまでの実験で、STED画像では、細胞内で20nm以下、固体材料で5nm以下の解像度、すなわち、回折限界共焦点の場合に比べて1600倍小さい観察エリアで取得されている。

CW-STED

当初はSTEDはパルスレーザを用いていた。STEDパルスが励起パルスにすぐに続くように設定していた。この条件は、高いレーザピーク強度とタイミングの期間において最適なSTED作用を保証するため、最も高い効率で蛍光の抑制を実現する。しかし、これらのパルス条件は通常レーザを注意して同期させる必要があり、モードロックレーザシステムなどの複雑で高価なレーザシステムを用意する必要を強いら

SPI® Lasers

溶接・切断・
マーキング・・・
微細加工に最適の
ファイバーレーザー

パルスファイバーレーザー
【redENERGY G4シリーズ】

CW ファイバーレーザー
【redPOWER OEMモジュール】
500W、750W、1000W

グリーン YVO_4
（8W）モデル

近日発売予定!!

http://www.japanlaser.jp/
E-mail: lase@japanlaser.jp
JLC JAPAN LASER 株式会社日本レーザー
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

れてきた。

これらの挑戦はとりわけ多くのライブセル実験に当てはまることであり、そうした場合、緑色または黄色の蛍光タンパク（GFP、YFP）などの蛍光ラベルが一般に使われている。これらの一般的な蛍光体は約488nmの青色励起に対して最適化されているため、STEDレーザの最適波長は約560～600nmになる。超高速パルスの場合、Ti：サファイアシステムで励起された光パラメトリック発振器（OPO）で供給されなければならない。

それゆえ、STEDにおける重要な前進はCWレーザの利用に切り換えることであった。高速走査との組み合わせによって、生細胞ナノスコープ画像の記録を可能にした[(2)、(5)]。ここで、数kHzの走査速度は、トリプレットまたは他の（「光不安定」な）暗状態にある蛍光体の個体群を成長させることを避け、そのことによって光損傷が最小化する。

CW記録に依然として残る欠点は、蛍光抑制中にも励起が継続して起きることであり、それゆえ0強度点の傾斜部分における蛍光抑制が多少不明瞭になることだ。この限界はCW-STED画像に不鮮明さとして現れ、物体の詳細な分離を困難にしている。

この問題は、CW-STEDレーザと時間ゲート検出を組み合わせて、パルスレーザ励起を満たすことでしのぐことができる。重要なことは、このゲート検出スキームは、低いSTEDレーザパワーを使用して高い空間分解能を実現し、かつ試料上の光ストレスが最小化されることだ。ゲートCW-STED（gSTED）と高速走査によって、100mW以下のCW-STEDレーザパワーで生細胞画像の記録が可能になっている[(3)]。

低ノイズが求められるgSTED

高速走査gSTEDナノスコピーは波長、パワー、光ノイズなどのレーザ性能に対してかなり特有な要求が求められている。パワーレベルのいかなるゆらぎも性能劣化をもたらすため、重要な必要条件は低ノイズのCWレーザを使用することである[(3)]。パワーの観点で、これまでの研究では100～250mWのSTED光が試料位置で必要であった[(3)]。位相マスクや他の光学系における損失ならびに標準的にかかる実験諸経費を考慮すると、少なくとも2Wのパワーをもつ黄色レーザが不可欠になる。

そのため我々は最近577nmで3Wを実現するOPSL（コヒレント社Genesis）にこの目的を果たすために切換えを行った。このレーザはノイズレベルが非常に低く、システム感度とデータ品質がかなり高い。このことは、OPSLを利用して試料に150mWパワーを供給することで得たgSTED画像に見ることができる（**図2**）。

ここに示されているのは40nmの黄色蛍光ビーズと有機色素Alexa488で標識化された哺乳動物細胞の微小管である。黄色蛍光ビーズと色素Alexa488はいずれも488nmのパルスレーザシステムで励起され、発光バンドはGFPまたはYFPと類似であり、577nmのOPSLシステムに対して最適化されている。これらの画像は、従来の回折限界共焦点画像を上回るgSTED技術の優れた解像度を示している。

gSTEDとFCSの組み合わせ

細胞生物学における多くの質問は動的画像についてである。著者らの研究興味の1つは、細胞膜中の脂質とタンパク質分子の運動を調べ、これらの運動が細胞シグナリングにおいて果たす役割（もしあれば）を研究することである。素人的な言葉で言えば、シグナリングとは、細胞が別の細胞に接触したことをいかにして知るのか、細胞核が外側細胞膜で起きていることをいかにして知るのか、あるいは、1つの細胞が隣接する細胞の挙動をいかにして知るのかなどを決定することである。

STEDは最高80フレーム/秒の速度のイメージングに適していることが証明されたが、この速度は脂質膜の組織化動力学のすべてを追跡するには十分でない。より高度のアプローチは、蛍光相関分光（FCS）技術を使って、ラベル化された脂質（またはタンパク質）

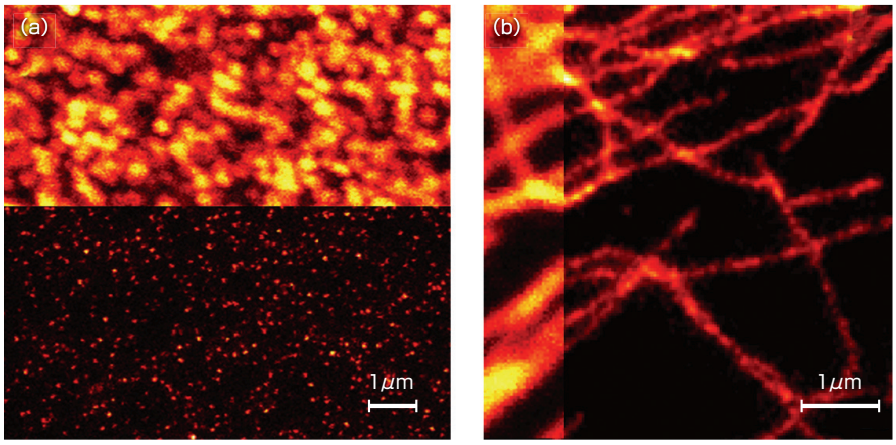

図2 577nm OPSLを使ったgSTEDイメージング。40nmの蛍光黄緑色ビーズ（a）とAlexa488で免疫染色された哺乳動物細胞中の微小管（b）の走査型共焦点顕微鏡画像とgSTED画像。（a）の空間分解能は50nmである。

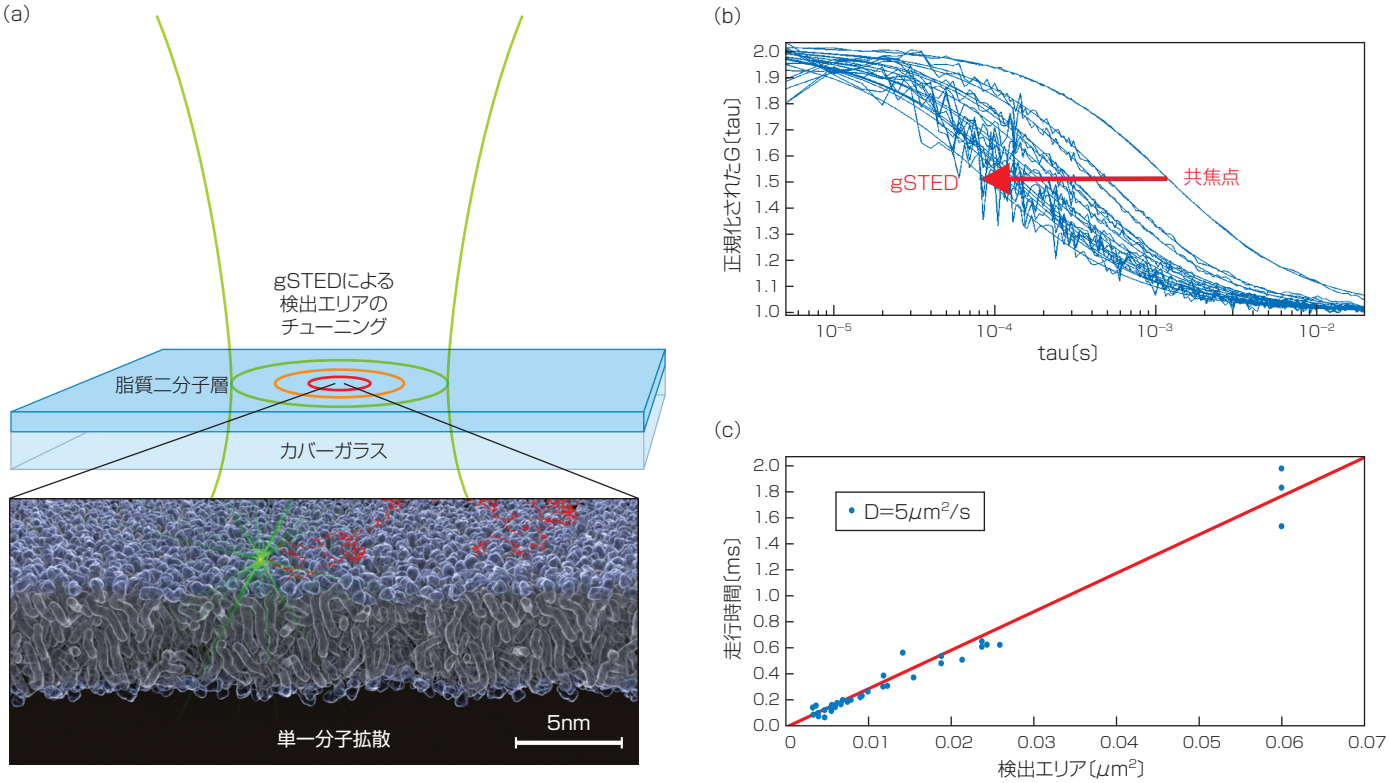

図3　577nm OPSLを使ったgSTED-FCS。(a)膜モデル系の図式：蛍光標識づけされたホスファチジルコリン(BODIPY-FL)の拡散がガラス上に堆積された液体脂質二分子層においてプローブされた。(b)典型的なgSTED-FCS測定で記録されたBODIPY-PCの相関曲線。gSTEDでは湾曲点がより短い時間側にシフトしていることから、検出エリアの縮小が示唆された。(c)FCS拡散則：平均トランジット時間が検出エリアのサイズ(直径の平方)に対してプロットされた。起源を通過する線形関係はテストされたすべての空間スケールでの自由ブラウン運動を示し、その拡散定数はD＝5 μm^2(赤色実線)であった。

が測定体積を出入りする時のゆらぎ強度データを解析することだ。

このアプローチは、これらの分子がナノスケールでいかに相互作用するかを観察し、それらの拡散特性がいかに不均一かを観察することを可能にする。例えば、FCSとSTEDの組み合わせを使用してこれまでに行った実験は蛍光標識化された脂質分子の自由な運動と妨げられた運動の違いを観察する空間と時間分解能を提供し、それらの相互作用の空間と時間スケールについての新情報を明らかにした[4]。

これらの最初のSTED-FCS測定はパルスSTEDレーザを使って実施された。しかし、CWレーザとゲート検出の組み合わせがFCS研究に有利であることが証明された[3]。そしてFCSまたはSTED-FCSを使用した蛍光信号のゆらぎ測定は超低ノイズのレーザの使用を必要とする。それゆえ、われわれは再び577nm OPSLを使って、保持された脂質膜中のBODIPY-標識化した脂質のgSTED-FCS測定を実施した(**図3**)。

正確なgSTED-FCSデータの記録を、STEDパワーの増加とゲート検出のタイミングの最適化によって、直径50nm以下の観察エリアに対して実行できた。観察エリアを通る脂質の走行時間はエリアのサイズに比例し、この種のモデル系で予測された通り、自由なブラウン拡散が示唆された。

参考文献

(1) S.W.Hell, "Far-Field Optical Nanoscopy," Science, 316, 1153-1158(2007).
(2) K.I. Willig, B. Harke, R. Medda, and S.W. Hell, "STED microscopy with continuous wave beams," Nat. Methods, 4, 915-918,(2007).
(3) G. Vicidomini et al., "Sharper low-power STED nanoscopy by time gating," Nat. Methods, 8, 571-573(2011).
(4) C. Eggeling et al., "Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell," Nature, 457, 1159-U1121(2009).
(5) G.R. Moneron et al, "Fast STED microscopy with continuous wave fiber lasers," Opt. Exp., 18, 1302-1309(2010).

著者紹介

アルフ・ホニグマン(Alf Honigmann)とクリスチャン・エゲリング(Christian Eggeling)は独マックスプランク生物物理化学研究所(Max Planck Institute for Biophysical Chemistry)のナノバイオフォトニクス部門。e-mail:ceggeli@gwdg.de.
マティアス・シュルツェ(Matthias Schulze)とアルノー・レペルト(Arnaud Lepert)は米コヒレント社(Coherent)。e-mail:matthias.schulze@coherent.com　URL: www.coherent.com.

LFWJ