

光の回折限界を超える蛍光顕微鏡法 PALM による細胞内微小構造の観察

PALM, Superresolution Fluorescence Microscopy Circumventing the Diffraction Limit of Light, to Explore Minute Structures of Cells

Susana Rocha^a, Herlinde De Keersmaecker^a, 阿部 充宏^b, 雲林院 宏^a,
 Johan Hofkens^a, 小林 俊秀^b, 宮脇 敦史^c, 水野 秀昭^{a, c*}
 Susana Rocha, Herlinde De Keersmaecker, Mitsuhiro Abe, Hiroshi Uji-i,
 Johan Hofkens, Toshihide Kobayashi, Atsushi Miyawaki and Hideaki Mizuno

^a Department of Chemistry, KU Leuven

^b 理化学研究所基幹研究所

^c 理化学研究所脳科学総合研究センター

要旨 蛍光顕微鏡は標的分子を特異的に標識、観察できる手法として生命科学の分野で広く利用されている。蛍光タンパク質発現による標識技術の開発によって生細胞での非侵襲的な標識が容易となり、ライブセルイメージングへ応用されている。近年、超高解像度顕微鏡と総称される光の回折限界を超えた蛍光顕微鏡法が開発された。本稿ではそのひとつ、photoactivated localization microscopy (PALM) について概説する。PALM は光スイッチング蛍光タンパク質で標的分子を標識し、その確率的なスイッチングを利用して空間的に近接する分子を時間的に分離して観察、座標情報を曲線回帰により求める。PALM は蛍光タンパク質標識・発現した標的分子を数十 nm の解像度で観察できる。また、著者等の開発したプローブを用いて脂質ラフトが染色・観察できる。さらに、生細胞へ応用し、分子動態の解析も可能である。

キーワード：超高解像度顕微鏡, PALM, 光スイッチング蛍光タンパク質, 脂質ラフト, 分子トラッキング

1. はじめに

蛍光顕微鏡は光学顕微鏡の一種であり、その解像度 δ はエアリーディスクで回折限界を規定したレーリーの判断基準に従う (図 1) (式 1)。

$$\delta = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (1)$$

ここで λ は光の波長、NA は光学系の開口数で、蛍光顕微鏡の場合、波長域は概ね 400 ~ 800 nm、対物レンズの開口数は 1.4 程度以下が一般的である。従って達成される解像度は 200 ~ 350 nm 程度であり、必ずしも生物系試料細部の観察要件を満たしていない。この回折限界を超えるべく開発されたのが超高解像度顕微鏡法であり、次の 4 種類に分類できる。

1) stimulated emission depletion (STED) 顕微鏡¹⁾ に代表される、励起光とともに励起光より長波長のドーナツ状の光を照射、誘導放出等で辺縁部を消光させた後に中央部のみの蛍光を読み出す顕微鏡、2) 縞状励起光の照射によって発生した

モアレ縞より試料の構造の高周波成分を解析する structured illumination microscopy (SIM)²⁾, 3) 光スイッチング蛍光分子の一分子蛍光観察とその分子座標計算に基づく photoactivated localization microscopy (PALM) /stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)³⁻⁶⁾, 4) 各画素での蛍光明滅の統計解析に基づく superresolution optical fluctuation imaging (SOFI) 顕微鏡⁷⁾。超高解像度顕微鏡法の解像度は十~数十 nm のレベルであり、電子顕微鏡には及ばない。しかしこの解像度の範囲では、試料調製の簡便さや高密度染色、多色染色、生細胞観察など、電子顕微鏡が苦手とする部分を補う新たな技術となる。中でも PALM/STORM は一分子観察に基づく分子レベルでの解析が特徴である。なお PALM と STORM は光学系及びデータ解析法は同じであり、PALM は光スイッチング蛍光タンパク質、STORM は合成色素の三重項間交差に伴う励起状態ラジカルアニオン生成によるスイッチングを利用する点が異なる⁸⁾。

2. 光スイッチング蛍光タンパク質

クラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) は 1960 年代に発見され⁹⁾, 1994 年に遺伝子¹⁰⁾ の異所性発現による蛍光発光が示された¹¹⁾。遺伝子改変によって様々な色の変異体を作られ¹²⁾, またサンゴやイソギンチャクからも GFP 類似タンパ

^a Celestijnenlaan 200G bus 2403, 3001 Heverlee, Belgium

^{b, c} 〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

* E-mail: hideaki.mizuno@chem.kuleuven.be

2014 年 7 月 3 日受付

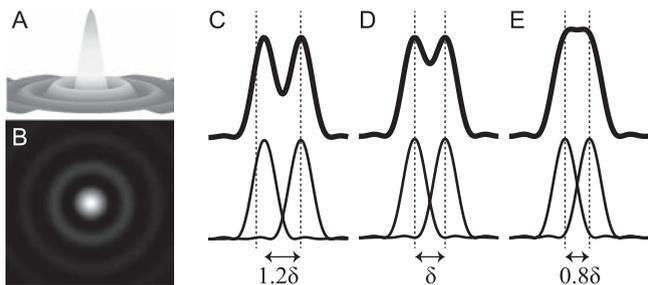


図1 点像分布関数とレーリーの判断基準。円形の光は回折により同心円状の顕微鏡像を結ぶ (A, B)。レーリーの判断基準での解像度 δ は中心から第一暗環の距離に相当する。二つの光点の距離が δ 以上るとき (C, D) には容易に区別できるが、 δ より近くなる (E) と区別できない。

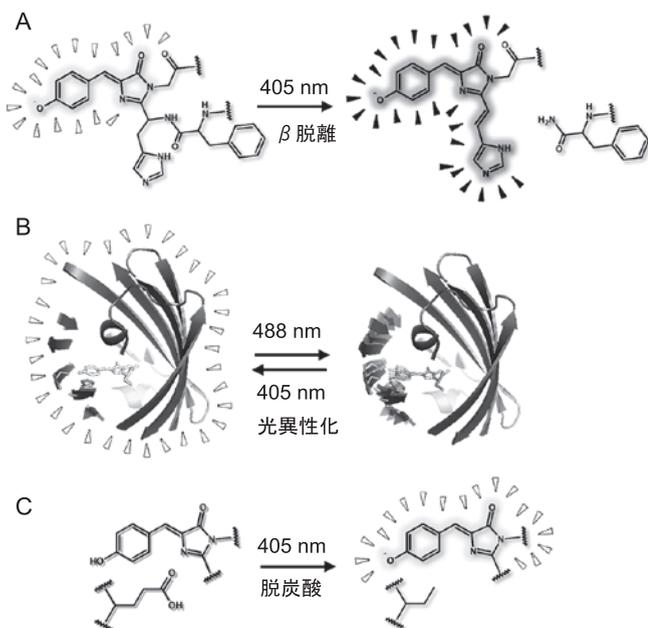


図2 光スイッチング蛍光タンパク質の分子機構。A 光変換型蛍光タンパク質 Kaede への紫外光照射は β 脱離反応を引き起こし、発色団の π 共役が広がり長波長シフトする⁴⁵⁾。B 光異性化型の Dronpa は、蛍光状態の発色団は固定された構造のため主な緩和が輻射遷移であるが、無蛍光状態では発色団及びその周辺が柔軟な構造をとり振動緩和の割合が増大する⁴⁶⁾。C 光活性化型の PAGFP は、光照射による発色団近傍グルタミン酸残基からの脱炭酸と発色団の立体配座の変化により吸収域シフトが起こる⁴⁷⁾。

ク質がクローニングされ¹³⁾、バリエーションが広がった¹⁴⁾。著者等は紫(外)光の照射によって蛍光が緑から赤に不可逆に変化する光変換型蛍光タンパク質 Kaede を発見した(図 2A)¹⁵⁾。Kaede はホモ 4 量体を形成するため、分子標識としての応用が制限されたが、その後単量体の光変換型蛍光タンパク質も開発された^{16~21)}。著者等は可逆的に光スイッチングする光異性化型蛍光タンパク質 Dronpa も開発した(図 2B)²²⁾。Dronpa は緑色蛍光をもつが、青緑色の照射で蛍光を失い、紫(外)光の照射によって回復する。光スイッチング蛍光タンパク質にはもう一種類、PA-GFP²³⁾ に代表され

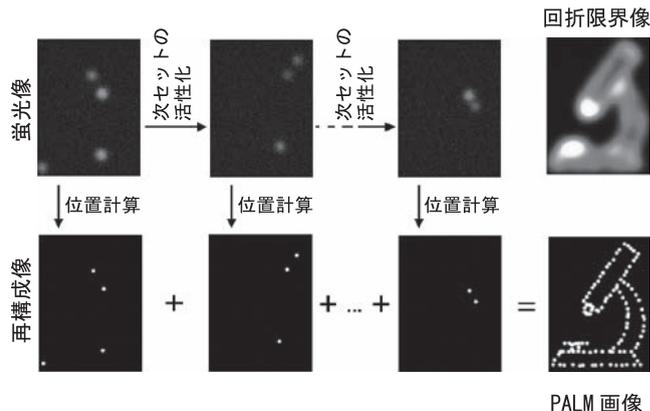


図3 PALM の原理 (シミュレーション)。上段は回折限界、下段は再構成画像。各フレームで確率的に on になった分子が観察、その座標が曲線回帰にて計算される。総フレームからの分子座標情報より PALM 画像を作成する。

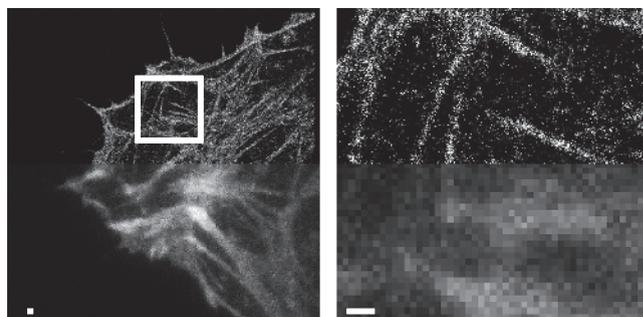


図4 KikGR-actin を発現した HeLa 細胞の PALM 画像。回折限界画像 (下) と PALM 画像 (上) を比較。右の画像は白枠で示した部分の拡大。スケールバーは 500 nm。

る光活性化型蛍光タンパク質が知られている(図 2C)。PA-GFP は紫外線照射により吸収域が 400 nm 付近から 490 nm 付近へシフトし、488 nm 励起に着目すると見かけ上無蛍光性から蛍光性に変化する。光スイッチング蛍光タンパク質の詳細は文献 24) を参照いただきたい。

3. PALM の原理

ここでは固定した培養細胞のアクチンファイバー観察を例に PALM の原理を説明する(図 3, 4)。図 4 は光変換型蛍光タンパク質 KikGR²⁵⁾ で標識したアクチンを発現した HeLa 細胞である。光変換前の KikGR は 488 nm 励起によって 517 nm を極大とする緑色蛍光を発するので、PALM に先立ち回折限界観察が可能である。KikGR は 405 nm 光で光変換され、561 nm 励起によって 593 nm を極大とする赤色蛍光を発するようになる。PALM 観察の際は、弱い 405 nm 光によってごく一部の(画像上で別の分子からの信号と重ならない程度) KikGR 分子を光変換、強い 561 nm 励起によって一分子からの信号を観察すると同時に褪色により分子を消去する。この画像取得を繰り返し、10,000 ~ 20,000 枚程度の画像を取得する。各分子の信号は点像分布関数に従った分布を示し、

その中央にエアリーディスクが現れる。このエアリーディスクを二次元ガウシアン関数(式2)に曲線回帰することによって分子の座標を規定でき、その際の平均二乗誤差は式3で示される²⁶⁾。

$$I = I_0 \exp \left[-\frac{1}{2} \left[\left(\frac{x-x_0}{s_x} \right)^2 + \left(\frac{y-y_0}{s_y} \right)^2 \right] \right] + b \quad (2)$$

$$\sigma_{x,y}^2 = \frac{s_{x,y}^2 + \frac{q^2}{12}}{N} + \frac{4\sqrt{\pi} s_{x,y}^3 b^2}{qN^2} \quad (3)$$

ここで s は回折限界解像度、 q はピクセルサイズ、 N は分子から得られた総光子数、 b は曲線回帰に用いたウィンドウの背景光子数である。このように分子位置の正確さは分子からの光子の数と s/n 比に依存するが、概ね 10 ~ 30 nm 程度で、PALM の解像度と解釈される。取得した一連の画像に現れるすべての分子の座標を一枚の画像にプロットすることによって PALM 画像を得る。図4では、回折限界画像では不明瞭な部分が、PALM ではアクチンバンドルとして観察できる。本法は光スイッチング蛍光タンパク質で標識可能な分子に広く応用できる。

4. PALM 光学系と画像処理

PALM は一分子観察に基づいており、背景光の効率的な除去が必須である。多くの場合、全反射条件で発生する近接場光を励起に用い、近接場外の分子を励起しない手法をとる。高開口数対物レンズ (>1.40) の辺縁部の瞳位置に励起用レーザー光を合焦、臨界角を越えた角度の励起光を対物レンズから出射させることにより試料のガラス-水界面で全反射照明を行う²⁷⁾ (図5A-C)。厳密な全反射条件を満たした場合はガラス表面から ~ 300 nm 程度に位置する分子のみが励起され、細胞底部の観察に適している。実際にはもう少し上部の観察が求められることも多く、この場合は臨界角をわずかに下回る角度で試料の一部を照明する薄層斜照明法を利用する²⁸⁾。

カールツァイス社の ELYRA P1 が市販されている唯一の PALM であり、画像取得からデータ解析まで容易に行える。PALM に必要な画像の取得だけならば、市販の他の全反射顕微鏡を最適化することによって可能である。また市販の倒立顕微鏡をベースに自作することも可能である (図5D)。励起光学系は、励起用のレーザーと光スイッチング用のレーザーを混合後にビーム径を調整、集光レンズを通して顕微鏡に導入、対物レンズ辺縁部の瞳位置に合焦させる。蛍光は顕微鏡内のチューブレンズで一旦結像するが、投影レンズで倍率を整えることによってピクセルサイズを 100 nm 程度に合わせ、カメラに導入する。このピクセルサイズは、ナイキスト周波数に基づき、回折限界 200 ~ 350 nm の点像分布関数回帰に最適化されている。一分子からの微弱な信号を観察するため electron multiplying charge coupled device (EM-CCD) カメラが主に用いられてきた。近年開発された scientific comple-

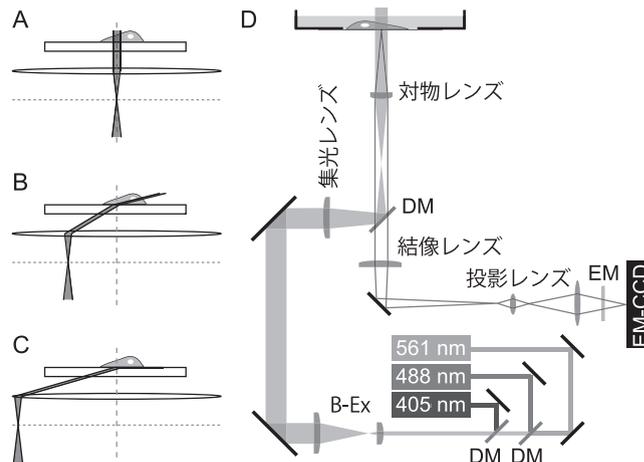


図5 PALM 顕微鏡の概略。A-C 励起光の導入位置と照射モード。励起光を対物レンズの瞳位置(点線)に合焦すると、対物レンズから平行光束として出射する。レンズに対して垂直な方向からレンズの中心(破線)に入射した光は垂直に出射する(A)。入射位置が辺縁部にずれると出射が傾く(B)。出射角がガラス-水界面の臨界角に達すると全反射照明となる(C)。D 光路図。励起用レーザーと光スイッチング用レーザーをダイクロミックミラー(DM)で混合、ビームエキスパンダー(B-Ex)でビーム径を調整した後、集光レンズで対物レンズ辺縁部の瞳位置に合焦させる。蛍光は顕微鏡内の結像レンズで一旦結像するが、ピクセルサイズが 100 nm 程度になるよう投影レンズで倍率を合わせ、蛍光フィルター(EM)を通した後にカメラに導入する。

mentary metal-semiconductor (sCMOS) カメラは、画像ノイズがポアソン分布に単純には従わないために補正が必要であるが²⁹⁾、PALM に使用できることが示されている。EM-CCD カメラの画像取得速度は 20 ~ 30 frame/s 程度であり、PALM 画像の取得には 6 ~ 10 分程度の時間を要するが、sCMOS カメラでは 100 frame/s で取得でき、3 ~ 5 倍程度の時間分解能の改善が期待される。

画像処理は、以下の通りである。1) バックグラウンド除去、フィルタリングによるノイズの低減、2) 分子位置の検出、3) 生データに戻り曲線回帰により分子座標を計算、4) ドリフトの補正や信頼度の低い座標情報の除去、5) 分子座標をプロットし PALM 画像を得る。我々は自作のプログラムにてこれらの処理を行っている²⁴⁾。また QuickPALM (<http://code.google.com/p/quickpalm/>), rapidSTORM (<http://www.super-resolution.biozentrum.uni-wuerzburg.de/home/rapidstorm/>), Localizer (<https://bitbucket.org/pdedecker/localizer>) 等のオープンソースの解析ソフトウェアもあり、ダウンロードして使用できる。

5. 形質膜の脂質ラフトの観察

前述したアクチンの例のように、PALM の観察には光スイッチング蛍光タンパク質標識した標的タンパク質の発現が多く用いられる。ここでは別の手法として、我々の開発したプローブでの膜ラフト観察を紹介する。形質(細胞)膜の脂

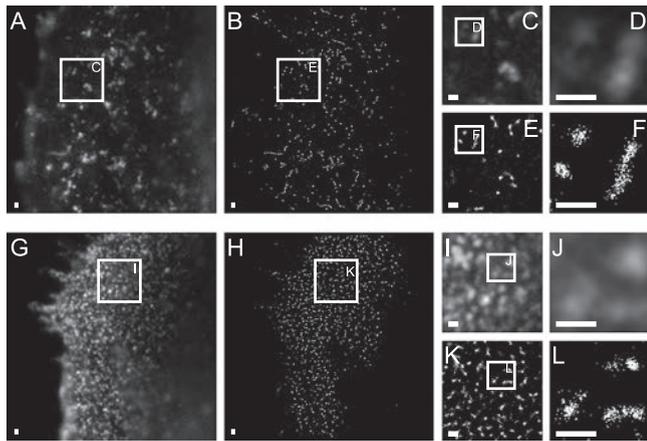


図6 コレステロール (A-F) 及びスフィンゴミエリン (G-L) に富む脂質ラフト. 回折限界画像 (A, C, D, G, I, J) と PALM 画像を表示 (B, E, F, H, K, L). スケールバーは 500 nm.

質分布は一様ではなく、コレステロールやスフィンゴ脂質に富む 10 ~ 200 nm 程度の微小領域があることが知られている³⁰⁾。また微小領域が情報伝達のプラットフォームとなる可能性が指摘されており、その構造と動態について興味を持たれるが、従来の光学顕微鏡の解像度では不十分である。一方 PALM での観察には光スイッチング蛍光タンパク質で脂質ラフトを標識する必要がある。我々は脂質に親和性を持つタンパク質性の毒素を利用し、脂質ラフトの可視化を試みた (図6)。ウェルシュ菌由来の θ -毒素は4つのドメインからなるタンパク質性毒素で、第四ドメイン (θ D4) のコレステロールへの親和性によって形質膜上に集積し、ホモ多量体化によってポアを形成、細胞溶解を引き起こす³¹⁾。第四ドメインのみでもコレステロールへの親和性は保持するが、多量体を形成せず、従って細胞溶解もおこらないことが知られていた³²⁾。我々は光スイッチング蛍光タンパク質で標識した第四ドメインを大腸菌で発現、精製することによって形質膜上のコレステロールに富む脂質ラフトを PALM で観察するためのプローブとした³³⁾。また、シマミミズの体腔液から単離されたポア形成毒素ライセニンのスフィンゴミエリン親和性を利用し³⁴⁾、スフィンゴ脂質に富む脂質ラフトのプローブを作製した。ライセニンの場合は、N 末端 160 アミノ酸残基を取り除くことによりポア形成能が失われるので (NT-Lys)³⁵⁾、光スイッチング蛍光タンパク質標識 NT-Lys を大腸菌で発現、精製し、プローブとした。これらのプローブで細胞を染色することにより、PALM での脂質ラフトの観察が可能となった。一般に、脂質の観察において問題になるのは試料の固定である。ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドによる固定はアミノ基の架橋反応に基づいており、原理的にほとんどの脂質は固定されず、観察中の分子運動が問題となる³⁶⁾。今回我々が作成したプローブはタンパク質性であり、固定化の過程でプローブ自身が架橋されることによって脂質ラフト構造が観察できる。脂質ラフトの詳細な観察に関しては、文献 33) を参照頂きたい。

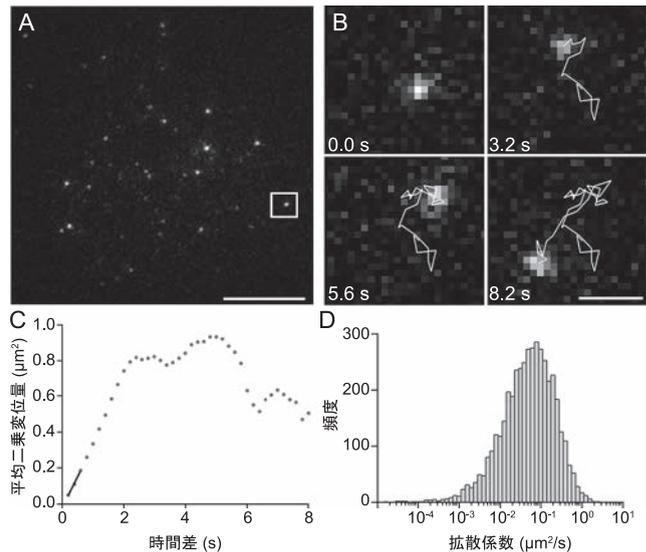


図7 PALM による EGFR の形質膜上拡散の解析. mEOS2 標識 EGFR を HeLa 細胞に発現し 200 ms ごとに観察. A 一分子観察のスナップ写真. B パネル A 上に白枠で示した分子の経時移動の様子. C 同分子の平均二乗変位. 直線で示されたポイントより拡散係数は $0.114 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と求められた. D 単一の細胞から計 4341 分子の軌跡を解析、拡散係数をヒストグラムで表示.

6. PALM を用いた分子トラッキング

PALM による超高解像度画像取得は、分子運動の影響を避けるため、固定した細胞で観察するのが普通である。裏を返すと、生細胞で観察を行うことによって分子動態の解析が可能である (single particle tracking PALM; sptPALM)³⁷⁾。図7は sptPALM によって mEOS2¹⁷⁾ 標識上皮成長因子受容体 (EGFR) の動態を解析したものである。分子動態解析は従来の分子トラッキングと同様の手法である。従来法では細胞あたりごく少量の分子を、褪色しない (金コロイドなど) または褪色しにくい (量子ドットなど) よう工夫された標識を用いて長時間観察するのに対し、sptPALM では各分子の観察は比較的短時間であるが、スイッチングを利用することによって多くの分子を観察する点が異なる。大きな母集団からの統計解析が長所となる反面、各分子のトレースが短いために非線形拡散の解析は難しくなる。

7. おわりに

本稿では PALM の原理と基本的な観察法について概説したが、現在も顕微鏡の更なる開発が続けられている。例えば、非点収差法³⁸⁾、複観察面法³⁹⁾、干渉法⁴⁰⁾、螺旋状点像分布関数法^{41,42)} による三次元 PALM が考案されている。同一細胞での複数分子種の観察も重要であり、多色化に適した蛍光タンパク質の開発が進められている⁴³⁾。さらに、生細胞の観察では、分子の動態と細胞の状態 (例えば刺激に対する反応) とを結びつけるため、機能イメージングとの組み合わせに興味を持たれる。我々は分子トラッキング中の細胞質 Ca^{2+} イメー

ジグ法を考案したが⁴⁴⁾, 更なる発展と応用が期待される。

一分子観察はよく空の星に喩えられる。昼間は背景が明るいため見えない星が、背景が暗い夜間には見えるように、一分子観察も全反射照明などの工夫で背景光を無くすことにより分子が見えるようになる。PALMは一分子観察に基づいており、理想的なPALMは背景の全くない夜空の星のみを観察するようなものである。特異的な分子観察という意味では長所と言えるが、このような観察では、分子が細胞の中のどこに局在するのか議論できない。今後、他の蛍光顕微鏡観察や電子顕微鏡観察をPALMと組み合わせることにより、PALMによる分子情報に背景の情報を重ねる技術の開発が期待される。

超解像度顕微鏡技術はここ数年でめざましく発展した。本稿ではPALMに焦点を絞ったが、それぞれの超高解像度顕微鏡法に長所・短所があり、お互いが相補的な役割を果たす。また前述の通り電子顕微鏡との融合も重要な課題である。今後、顕微鏡技術の開発とともに、これらの技術が生命科学分野の発展に活かされることが望まれる。

謝 辞

本稿にて紹介した観察法の開発にあたり、大野一岩下淑子博士及び牧野麻美博士に多大な協力を頂いた。また観察に用いたヒトEGFR遺伝子は渋谷正史博士より御供与頂いた。mEOS2遺伝子はLoren Looger博士によって開発されたものをAddgeneより入手した(plasmid 20341)。PALM観察にあたり、Carl Zeiss社に協力頂いた。この場を借りて御協力頂いた方々へ心から感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Hell, S.W. and Wichmann, J.: Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.*, **19**, 780–782 (1994)
- 2) Gustafsson, M.G.L.: Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13081–13086 (2005)
- 3) Betzig, E. *et al.*: Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, **313**, 1642–1645 (2006)
- 4) Hess, S.T., Girirajan, T.P.K. and Mason, M.D.: Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.*, **91**, 4258–4272 (2006)
- 5) Rust, M.J., Bates, M. and Zhuang, X.: Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods*, **3**, 793–795 (2006)
- 6) Heilemann, M. *et al.*: Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **47**, 6172–6176 (2008)
- 7) Dertinger, T., Colyer, R., Vogel, R., Enderlein, J. and Weiss, S.: Achieving increased resolution and more pixels with Superresolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI). *Opt. Express*, **18**, 18875–18885 (2010)
- 8) Heilemann, M., van de Linde, S., Mukherjee, A. and Sauer, M.: Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angew.*

Chem. Int. Ed. Engl., **48**, 6903–6908 (2009)

- 9) Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y.: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminescent hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell Comp. Physiol.*, **59**, 223–239 (1962)
- 10) Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J.: Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, **111**, 229–233 (1992)
- 11) Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C.: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**, 802–805 (1994)
- 12) Tsien, R.Y.: The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509–544 (1998)
- 13) Matz, M.V. *et al.*: Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 969–973 (1999)
- 14) Shaner, N.C. *et al.*: Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1567–1572 (2004)
- 15) Ando, R., Hama, H., Yamamoto-Hino, M., Mizuno, H. and Miyawaki, A.: An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12651–12656 (2002)
- 16) Wiedenmann, J. *et al.*: EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15905–15910 (2004)
- 17) McKinney, S.A., Murphy, C.S., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W. and Looger, L.L.: A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat. Methods*, **6**, 131–133 (2009)
- 18) Gurskaya, N.G. *et al.*: Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat. Biotechnol.*, **24**, 461–465 (2006)
- 19) Habuchi, S., Tsutsui, H., Kochaniak, A.B., Miyawaki, A. and van Oijen, A.M.: mKikGR, a monomeric photoswitchable fluorescent protein. *PLoS ONE*, **3**, e3944 (2008)
- 20) Fuchs, J. *et al.*: A photoactivatable marker protein for pulse-chase imaging with superresolution. *Nat. Methods* (2010). doi: 10.1038/nmeth.1477
- 21) Zhang, M. *et al.*: Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins. *Nat. Methods*, **9**, 727–729 (2012)
- 22) Ando, R., Mizuno, H. and Miyawaki, A.: Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science*, **306**, 1370–1373 (2004)
- 23) Patterson, G.H. and Lippincott-Schwartz, J.: A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, **297**, 1873–1877 (2002)
- 24) Rocha, S., De Keersmaecker, H., Uji-i, H., Hofkens, J. and Mizuno, H.: Photoswitchable fluorescent proteins for superresolution fluorescence microscopy circumventing the diffraction limit of light. *Methods Mol. Biol.*, **1076**, 793–812 (2014)
- 25) Tsutsui, H., Karasawa, S., Shimizu, H., Nukina, N. and Miyawaki, A.: Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter. *EMBO Rep.*, **6**, 233–238 (2005)
- 26) Thompson, R.E., Larson, D.R. and Webb, W.W.: Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.*, **82**, 2775–2783 (2002)
- 27) Tokunaga, M., Kitamura, K., Saito, K., Iwane, A.H. and Yanagida, T.: Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions

- achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 47–53 (1997)
- 28) Tokunaga, M., Imamoto, N. and Sakata-Sogawa, K.: Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat. Methods*, **5**, 159–161 (2008)
 - 29) Huang, F. *et al.*: Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms. *Nat. Methods*, **10**, 653–658 (2013)
 - 30) Pike, L.J.: Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid. Res.*, **47**, 1597–1598 (2006)
 - 31) Iwamoto, M., Ohno-Iwashita, Y. and Ando, S.: Role of the essential thiol group in the thiol-activated cytolysin from *Clostridium perfringens*. *Eur. J. Biochem.*, **167**, 425–430 (1987)
 - 32) Shimada, Y., Maruya, M., Iwashita, S. and Ohno-Iwashita, Y.: The C-terminal domain of perfringolysin O is an essential cholesterol-binding unit targeting to cholesterol-rich microdomains. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 6195–6203 (2002)
 - 33) Mizuno, H. *et al.*: Fluorescent probes for superresolution imaging of lipid domains on the plasma membrane. *Chem. Sci.*, **2**, 1548–1553 (2011)
 - 34) Yamaji, A. *et al.*: Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5300–5306 (1998)
 - 35) Kiyokawa, E. *et al.*: Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains. *J. Biol. Chem.*, **280**, 24072–24084 (2005)
 - 36) Tanaka, K.A.K. *et al.*: Membrane molecules mobile even after chemical fixation. *Nat. Methods*, **7**, 865–866 (2010)
 - 37) Manley, S. *et al.*: High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat. Methods*, **5**, 155–157 (2008)
 - 38) Huang, B., Wang, W., Bates, M. and Zhuang, X.: Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, **319**, 810–813 (2008)
 - 39) Juette, M.F. *et al.*: Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nat. Methods*, **5**, 527–529 (2008)
 - 40) Shtengel, G. *et al.*: Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3125–3130 (2009)
 - 41) Pavani, S.R.P. *et al.*: Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 2995–2999 (2009)
 - 42) Grover, G., Quirin, S., Fiedler, C. and Piestun, R.: Photon efficient double-helix PSF microscopy with application to 3D photo-activation localization imaging. *Biomedical Optics Express*, **2**, 3010–3020 (2011)
 - 43) Subach, F. *et al.*: Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy. *Nat. Methods*, **6**, 153–159 (2009)
 - 44) De Keersmaecker, H. *et al.*: EGF receptor dynamics in EGF-responding cells revealed by functional imaging during single particle tracking. *Biophys. Rev. and Lett.*, **8**, 229–242 (2014)
 - 45) Mizuno, H. *et al.*: Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein. *Mol. Cell*, **12**, 1051–1058 (2003)
 - 46) Mizuno, H. *et al.*: Light-dependent regulation of structural flexibility in a photochromic fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9227–9232 (2008)
 - 47) van Thor, J.J., Gensch, T., Hellingwerf, K.J. and Johnson, L.N.: Phototransformation of green fluorescent protein with UV and visible light leads to decarboxylation of glutamate 222. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 37–41 (2002).