

新規光技術を用いた多光子顕微鏡の空間分解能・時間分解能向上

Spatial and Temporal Resolution Improvement of Multi-Photon Microscopy by Utilizing Novel Optical Technologies

大友 康平^{a, b}, 渡邊 裕貴^b, 山中 祐実^b, 後藤 亜衣^b, 日比 輝正^a, 根本 知己^{a, b}

Kohei Otomo, Hiroataka Watanabe, Yumi Yamanaka, Ai Goto, Terumasa Hibi and Tomomi Nemoto

^a北海道大学電子科学研究所

^b北海道大学大学院情報科学研究科

要旨 多光子励起過程を利用したレーザー走査型蛍光顕微鏡（多光子顕微鏡）法は、励起の局所性、低侵襲性、深部到達性という生体内部の微小構造を可視化する上で好ましい特徴を有する。蛍光バイオイメージングに使用する発色団の大半は可視域にスペクトル特性を有するため、本法の励起光には近赤外域で発振するレーザー光源を用いる必要がある。そのため、集光スポットのサイズが波長依存的に大きくなり、一光子励起過程を前提とした共焦点顕微鏡法と比較すると、空間分解能の点で劣る。著者らは多光子顕微鏡法について、超解像顕微鏡法の一つである誘導放出制御（STED）法の適用による空間分解能向上、ニポウディスクを用いた多点走査機構による共焦点効果の適用による時空間分解能の向上に成功したので、可視化事例とともに本稿で紹介する。

キーワード：蛍光バイオイメージング、多光子顕微鏡法、STED 顕微鏡法、スピニングディスク

1. 多光子顕微鏡法

対象分子を蛍光標識し、高い時空間分解能で顕微可視化する蛍光バイオイメージング法は、近年の生物学、医学研究においてツールとなっている¹⁾。本法は生命科学研究者の要求に応える形で、顕微鏡法等の測定機器側のハード面、測定対象の標識技術や試料調製技術のようなソフト面の双方において多様な発展を遂げてきた。中でも、検知器にピンホールを前置し、対物レンズ焦点からの蛍光のみを導くことで光学断層像観察を実現したレーザー走査型蛍光顕微鏡（共焦点顕微鏡）法の実用性は高く評価されている²⁾。レーザー走査型顕微鏡の空間分解能は、Ernst Abbeにより定義された空間分解能“レンズの特性と光の波長で決まる集光スポットの回折ひろがり”にほぼ従う。Abbeの空間分解能は光の波長と対物レンズの開口数（NA; Numerical Aperture）の比で記述され、その焦平面方向における限界は、波長の半分程度である。蛍光発色団の多くは可視域にスペクトル特性を有することから、サブ μm オーダーの空間分解能による細胞内小器官の高精細可視化解析が可能である。

一方で、より生体深部の微小構造を対象とした蛍光バイオイメージング法として提案されたのが多光子励起過程を利用

したレーザー走査型蛍光顕微鏡（多光子顕微鏡）法である^{3,4)}。本法は超短パルスレーザーを試料に照射し、二光子励起、三光子励起による蛍光を取得するものである。多光子励起過程を誘起するためには高い光子密度が必要とされるため、観測可能な蛍光は対物レンズによる集光スポットにほぼ限局される。つまり、焦点外蛍光がそもそも生じないため、共焦点ピンホールを設置せずとも、光学断層像の取得が可能となる。また、先述の通り、蛍光バイオイメージング用途の発色団のスペクトル特性から、励起には近赤外域にて発振するレーザー光源が用いられる。本波長域は、補酵素等に由来する生体分子の電子吸収帯と水分子の振動吸収帯の狭間に位置していること、可視波長域に比べて光散乱の影響が少ないことから、『生体の窓』と呼ばれている。このことは本法に高い生体深部到達性の特徴を与える。さらに本法は、焦点外励起がほとんど起こらないことも手伝い、観測による侵襲性が低いという特筆すべき特徴も有している。安定に動作する近赤外域波長可変モード同期チタン-サファイヤ（Ti-Sa）レーザー光源の技術発展は本法の普及に大きく貢献した⁵⁾。生物学的現象の可視化解析においては、前述した励起の局所性、深部到達性、低侵襲性のみがパラメータとなるわけではない。空間分解能、時間分解能、広視野性のような様々なパラメータが存在する。これらは互いにトレードオフの関係にあるため、可視化したい現象と照らし合わせ、生物学研究者は手法を選択する必要がある。著者らの研究グループでは、多光子顕微鏡法に特に着目し、その特徴を維持したまま、他のパラメー

〒001-0020 北海道札幌市北区北20条西十丁目

TEL: 011-706-9362; FAX: 011-706-9363

E-mail: otomo@es.hokudai.ac.jp

2017年4月16日受付, 2017年5月9日受理

タについて機能向上を図る技術開発研究を行っている。これまでに深部到達性の更なる向上^{6,7)}、空間分解能の向上^{8,9)}、時空間分解能の向上¹⁰⁾に成功している。本稿においてはこのうち、超解像顕微鏡法の一つである誘導放出制御 (STED) 法¹¹⁾の適用による空間分解能向上⁹⁾、ニポウディスク式多点走査機構の導入による時空間分解能向上¹⁰⁾に関する研究について紹介する。

2. 二光子励起 STED 顕微鏡法

多光子顕微鏡法の空間分解能も、共焦点顕微鏡法と同様に、Abbe の定義にほぼ従う。多光子顕微鏡法の場合、共焦点顕微鏡法よりも長波長域の励起光を用いる必要があるため、集光スポットのサイズが大きくなる。回折広がりよりも十分に小さな試料の二光子励起、三光子励起による蛍光像は、集光スポットにおける励起強度分布の二乗、三乗に比例した蛍光輝度分布を示す。多光子顕微鏡の空間分解能は、同じスペクトル特性を持つ発色団を観測した場合、共焦点顕微鏡のものよりやや劣る。例えば、NA 1.2 の対物レンズを用い、450 nm 光の集光スポットの強度分布、900 nm の近赤外光による集光スポットの二乗値強度分布を計算すると、焦平面内の半値全幅 (FWHM) でそれぞれ 240 nm、320 nm となる¹²⁾。共焦点顕微鏡法の空間分解能はこの集光スポットサイズに対し、検知器前置ピンホールの実効径との畳み込み積分で記述されるため、ピンホールのサイズを絞ることで更に向上する。

一方で近年、Abbe の定義した空間分解能の限界を、様々な光学、化学原理に基づいて打破した新規光学顕微鏡法が複数報告されている^{11,13,14)}。これらは超解像顕微鏡法と呼ばれ、現在、主要顕微鏡メーカーから様々な顕微鏡が市販され、実用化に至っている。方法論の確立に貢献した三名の研究者が 2014 年のノーベル化学賞を受賞したことは記憶に新しい。このうち、著者らが着目した STED 法は、ノーベル賞受賞者の一人である Max Planck 研究所の Stefan Hell 博士により、1994 年に理論が提案され¹⁵⁾、2000 年に自身らの手の実験により実用性が立証された¹⁶⁾。STED 法は励起レーザー光の集光スポットに、誘導放出制御用のレーザー光 (STED 光) を重ねて集光し、蛍光由来の点像分布関数 (PSF) を変化させることを基本原理とする。通常、STED 光には光渦のような集光スポットが中空形状となる光を用いる。励起レーザー光により励起状態となった蛍光分子のうち、STED 光照射を受けたものは STED 光と同一波長の光子を放出して基底状態に戻るが、STED 光照射を受けてないものは分子種により決まる蛍光寿命に従った蛍光光子を放出して基底状態に戻る。つまり、STED 光と同一の波長成分を光学フィルターにて除いた後に検知器に導くことで、STED 光の集光スポットの中空部分のみを PSF として検出することが可能となる。STED 顕微鏡の空間分解能 R_{Sted} は、Abbe の空間分解能の定義に則ると、

$$R_{\text{Sted}} = 0.5\lambda/NA(1 + I_{\text{Sted}}/I_{\text{Sat}})^{1/2}$$

の式にて記述される¹¹⁾。ここで、 λ は光の波長、NA は対物レンズの開口数、 I_{Sted} は STED 光強度、 I_{Sat} は発色団の励起効率、量子収率、蛍光寿命、STED 光の誘導放出効率に依存して決まる光強度基準値である。 $I_{\text{Sted}}/I_{\text{Sat}}$ は誘導放出過程の飽和度合いを反映し、値が高いほど空間分解能の向上が見込まれる。蛍光バイオイメージング法としての STED 顕微鏡法の空間分解能は、数十 nm から 100 nm 強というのが一般的である。

近年、二光子顕微鏡法の空間分解能の向上を図り、STED 顕微鏡法を応用する試みが行われている。二光子励起 STED 顕微鏡法は、2009 年に Hell 博士のグループから初めて報告がなされた¹⁷⁾。さらに 2013 年の Biophysical Journal 誌においては、異なる 2 つの研究グループから、本法によるマウス急性脳スライス標本の表層から 50 ~ 100 μm 深部における微小スパイン構造を 100 nm 前後の空間分解能にて可視化したことが報告された^{18,19)}。本法は生体組織や生物固体内部におけるナノ構造を、蛍光バイオイメージングの特徴を担保したままに可視化できる方法として期待されている。これらの報告を受け、著者らの研究グループでも新規に二光子励起 STED 顕微鏡を構築した⁹⁾。我々のシステムにおける最大の特徴は、空間位相変調器の一つである透過型液晶デバイス (tLCD) を用いて生成させた光渦を STED 光として用いた点である。STED 顕微鏡に導入する光渦は、螺旋状位相板を用いて生成するのが一般的であるが、近年は反射型の空間位相変調器を用いた光渦作成と STED 顕微鏡法への応用例が報告されつつある²⁰⁾。構築した二光子励起 STED 顕微鏡には二種類の tLCD を用いた。一つは 24 分割型 tLCD であり、螺旋状の位相分布の生成に用いた (図 1a)。もう一つは非分割型 tLCD であり、これは印加電圧依存的な可変波長板として機能する。円偏光の回転方向と一致する方向に位相を回転させた光渦は急峻な集光スポットを与える。しかし、予め円偏光とした光渦を顕微鏡に導光しても、光路に存在する様々な光学素子に偏光状態を攪乱され、試料位置においては楕円偏光になってしまう。そこで我々は、非分割型 tLCD に印加する電圧を制御することで偏光成分の位相差を相殺し、STED 光を試料位置において円偏光とした。構築した二光子励起 STED 顕微鏡システムの分解能を評価するために、微小蛍光ビーズの二光子励起蛍光像、二光子励起 STED 像を取得した (図 1b)。ビーズ像の断面プロファイルの FWHM から見積ると、通常の二光子顕微鏡と比べ、構築したシステムは、およそ二倍の空間分解能を有していた。さらに、本システムを生物学的試料に適用した例として、微小管を蛍光抗体法にて標識した固定培養細胞の画像を図 1c に示す。通常の二光子顕微鏡では判別が困難な微小管ネットワークの詳細の可視化に成功していることがわかる。

現状のシステムの空間分解能は 100 nm を下回るに至っていないが、この主要因は誘導放出効率の低さが原因であり、本システムが連続波レーザーを STED 光としていたことに起因する。そのため、STED 光をパルス化し、励起光パルス

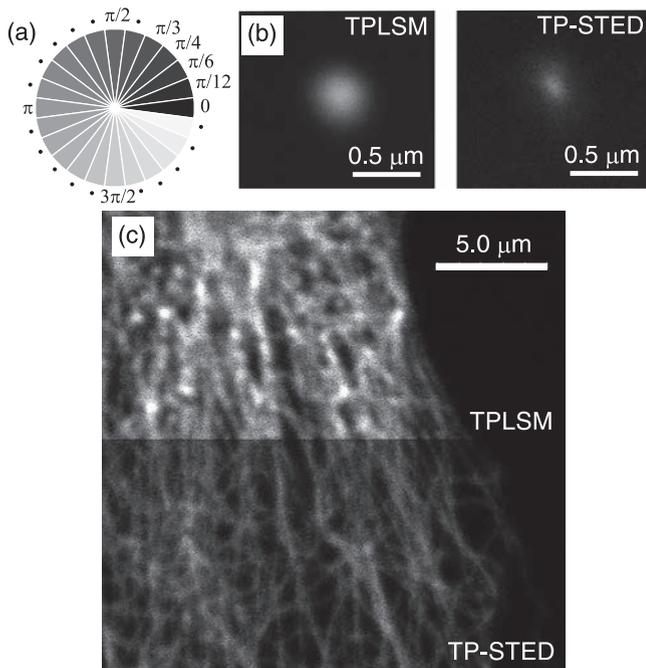


図1 (a) 透過型液晶デバイスを用いて作成した光渦の位相分布. (b) 100 nm 径の蛍光ビーズの二光子励起蛍光像と二光子励起 STED 像比較. (c) 微小管に蛍光色素を免疫標識した COS-7 細胞の二光子励起蛍光像と二光子励起 STED 像比較.

とのタイミングを同期することにより、誘導放出効率の向上や細胞毒性の軽減が期待できる。著者らは現在、新規のピコ秒パルス半導体レーザー光源^{7,21)}をベースとした新たなシステムの構築に取り組んでおり、顕著な効果を確認しているため、いずれ報告したい。

3. 多点走査型二光子共焦点顕微鏡法

蛍光バイオイメージング法の利点の一つは低侵襲性であり、生理機能を保持した動的な生体試料の可視化解析に適用できる点にある。必然的に時間分解能は重要なパラメータとなる。生体内現象の時間スケールは現象によって異なるが、蛍光バイオイメージングにおいて、ビデオレート (30 fps) は高速性の一つの基準となる。市販の共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡の多くは励起レーザー光の走査に2枚の可動式ミラーを用いており、この動作速度が装置の時間分解能を決定する。可動式ミラーにはガルバノミラー、共振ミラーを用いるのが一般的である。前者は安定性、後者は高速性に優れており、共振ミラーを用いたレーザー走査はビデオレートを超える画像取得を実現する²²⁾。しかしながら、高速動作するミラー位置の安定性に依存し、画質が乱れることがしばしば問題となる。一方で、励起レーザー光を分割し、多点走査することでレーザー走査型顕微鏡の時間分解能を向上させる試みがなされており、その中でも、スピニングディスクを用いた共焦点レーザー走査ユニットは生物学研究者から広く用いられている (例えば文献 23))。本ユニットは励起レーザー光を分割するマイクロレンズアレイディスクおよび共焦点ピンホール

アレイが螺旋状に配置されたニポウディスクから成り、ディスクを高速回転させることでレーザー光の多点高速走査、蛍光の共焦点取得を実現する。走査速度はディスクにおけるマイクロレンズアレイ、ピンホールアレイの配置やディスクの回転速度に依存するものの、サブミリ秒～ミリ秒の高安定なレーザー走査が可能である。

ニポウディスク式スキヤナを用いた二光子顕微鏡は2000年に藤田らから初めて報告がなされた²⁴⁾。先述の通り、二光子顕微鏡法は励起の局所性を有することから、検出器に対し、共焦点ピンホール等を前置しなくとも光学断層像の取得が可能である。しかしながら、共焦点顕微鏡法と同様に、二光子顕微鏡法の場合でも、検出光学系の共焦点位置にピンホールを設置することにより空間分解能を向上させることは可能である。先述の STED 顕微鏡法のような超解像顕微鏡法とは本質的に異なるものの、本法は二光子顕微鏡法の空間分解能の短所を克服しつつ、高い時間分解能を担保できる手法であり、その実用性は極めて高い。しかしながら、関連文献は顕微鏡法開発の方法論のみにとどまっており、生物学研究への適用は未だ報告されていない。本法は原理として、励起レーザー光を数百本に分割する必要があるため、高強度で発振するレーザー光源が不可欠である。二光子顕微鏡に一般的に用いられる Ti-Sa レーザー等では強度が足りないことは、本法が実用化に至らない主要因と言える。2013年、下澤らはスピニングディスクを改良し、近赤外域励起光の透過率を高めることで、生体試料表層から 100 μm 深部の光学断層像を高解像かつ高速に取得可能であることを示した²⁵⁾。しかしながら、Ti-Sa レーザーの強度不足は依然問題であった。同稿における画像の取得には、512 ピクセル × 512 ピクセル (ピクセルサイズ 16 μm × 16 μm) の EM-CCD カメラを用いており、観察視野は 117 μm × 117 μm であったが、実際に二光子蛍光像が観察できた範囲はおおよそ直径 40 μm の円内のみであり、素子の1割程度しか活用が適わなかった。同稿においても、素子全域を活用した広視野イメージングのためには Ti-Sa レーザーの5～10倍の光強度が必要であると考察されている。

そこで著者らの研究グループは、近年、市販化されつつある低繰り返し周波数、高ピークパワーを有するイッテルビウム (Yb) レーザー光源をベースとしたスピニングディスク共焦点二光子顕微鏡を構築し、カメラ素子全域を活用した広視野イメージングが可能であることを立証した¹⁰⁾。本光源の発振帯域は 1042 nm のみだが、先述の Ti-Sa レーザー光源の同帯域光と比較して、20倍強のピークパワーを有する。このような低繰り返し周波数のレーザー光源を用い、単点走査により高速画像取得を行う場合は、ピクセル取得時間と繰り返し周波数の関係を考慮する必要がある。例えば、512 ピクセル × 512 ピクセルの画像を共振ミラー走査にてビデオレートで取得する場合、ピクセル取得時間は 50～70 ns とされている。今回用いた Yb レーザーの繰り返し周波数は 10 MHz であり、上記条件においては1ピクセルあたりの蛍

表1 二光子スピニングディスク共焦点顕微鏡の空間分解能

	FWHM _x	FWHM _y	FWHM _z
計算値 ^{*1}	404 nm	307 nm	823 nm
実測値 ^{*2}	338 ± 7 nm	314 ± 2 nm	616 ± 21 nm

^{*1} 1042 nm の直線偏光(x方向)をN.A. 1.3の対物レンズの集光スポットプロファイルの二乗値から算出. ^{*2} 170 nm 径ビーズ像の二光子励起蛍光像から算出 (n = 5).

光輝度取得に励起光パルスが行き渡らないこととなる. これにより, 画質が著しく低下することが推察される. しかしながら, スピニングディスク式スキャナは励起光を数百~千本に分割して試料に同時照射する原理上, ミリ秒オーダーの画像取得においても本関係性を考慮する必要性が低くなる.

構築したシステムの空間分解能を評価するために, 微小蛍光ビーズ像と, 通常の二光子顕微鏡の空間分解能に相当する集光スポットの二乗プロファイルについて, FWHMによる比較を行った(表1). 共焦点ピンホールの効果により, 特にz方向において, 顕著な空間分解能向上が確認された. 本システムにおいては近赤外光透過率を重視し, 比較的大きな径のピンホールを配列させたスピニングディスクを用いているが, 径を小さくすることで更に空間分解能が向上することも既に確認されている²⁵⁾. 構築したシステムを用いた高速イメージング例として, 本稿では, マウス血管の*in vivo* イメージング事例を紹介する. 麻酔下のマウスの腹部にスキップラップ処置を施し, 尾静脈注射したスルホローダミンB(SRB)に由来する二光子励起蛍光信号を, 108 fpsの高速で取得した(図2). 血漿成分に由来するSRB蛍光信号の影となっている血球成分がマウス皮膚血管中を高速で移動する様子を, 100 μm超の広視野にて高精細観察することに成功した. 本測定においては蛍光信号を分光せずに取得したが, 血管内皮のコラーゲン繊維に由来する第二次高調波発生信号も同時に観察されている. 検知光学系の改変により, これらの各信号は分離取得することも容易である.

高解像かつ高速にて生体試料内部を可視化できる本システムは, 市販の倒立, 正立顕微鏡をベースとしていることから使用も簡便である. このことから, 既に様々な生物学研究者にツールとして使用されており, 良好な結果が得られつつある. 高速駆動が可能なピエゾzスキャナとの併用により, z方向の空間分解能に優れる利点を活かした高速xyzタイムラプスイメージングが可能である点, 二光子顕微鏡は一波長での多色同時励起が比較的容易であるという特徴²⁶⁾を活かし, 分光検知光学系による多色完全同時イメージングが可能である点も特筆すべき特徴である. 報告したシステムが抱える課題の一つとしては, 励起波長が1042 nmのみであるという点が挙げられる. 本帯域光は, 黄色, 赤色蛍光発色団を効率良く励起できるものの, 生物学研究において高い汎用性を有する緑色蛍光発色団の励起効率が悪い. 克服のため, 著者らは緑色蛍光発色団を励起できる新規の高ピークパワーレー

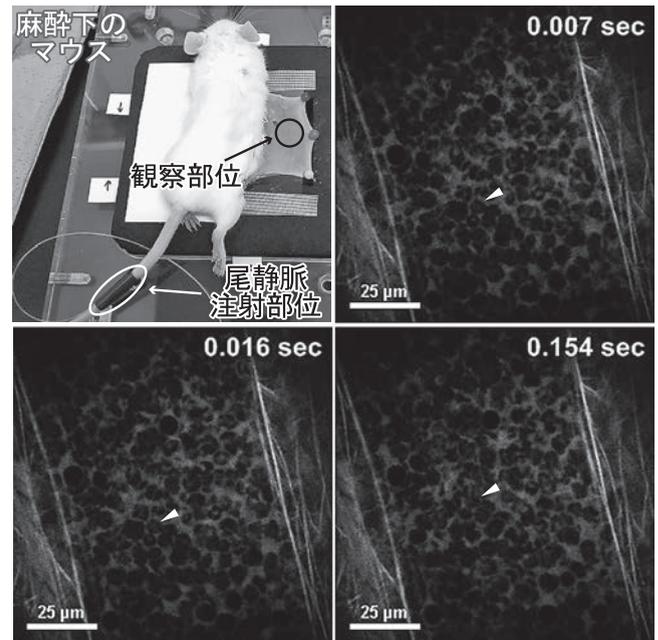


図2 二光子スピニングディスク共焦点顕微鏡によるマウス皮膚血管の108 fps *in vivo* 超高速イメージング. 画像は1, 2, 18フレーム目. 矢頭は同一の血球を示す.

ザーの同システムへの導入, Ti-Sa レーザー光と比較して20~30倍高い輝度での蛍光像取得に成功したので, 本成果についてもいずれ報告したい.

4. 結 語

本稿では, 多光子顕微鏡法を基盤とし, 著者らが現在進行形で取り組んでいる2つの蛍光バイオイメージングの機能向上研究成果を紹介した. 本稿において紹介した新規技術を含む蛍光バイオイメージング法の技術開発は, 現在も目覚ましい勢いで進んでおり, 開発の着眼点は単なるパラメータ向上のみに止まらない. これからの顕微鏡技術開発は, これまでも増して, 明確な観察対象, 生物学的現象を意識し, 真に必要なとされる技術として開発されなければいけない. 著者らも, 本稿にて紹介した技術を更に向上させることにより, 生物学研究の発展に貢献していければと考えている.

5. 謝 辞

本稿にて紹介した研究は, 独立行政法人科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業チーム型研究(CREST)「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」領域の「ベクトルビームの光科学とナノイメージング」(代表: 東北大学・佐藤俊一教授), 文部科学省科学研究費補助金(16K15103, 15H05953 “Resonance Bio”, 16H06280 “Advanced Bioimaging Support”), 物質・デバイス領域共同研究拠点: 人・環境と物質をつなぐイノベーション創出ダイナミック・アライアンス, 及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト」の支

援を受けて行われました。遂行に当たり、共同研究者である東北大学多元物質科学研究所の佐藤俊一教授、同研究所の小澤祐市准教授、同大学未来科学技術共同研究センターの横山弘之教授、基礎生物学研究所の長谷部光泰教授、村田隆准教授には、多岐にわたる御助言を賜りました。また、本研究で用いた透過型液晶素子は、シチズン時計株式会社の橋本信幸博士、栗原誠様、田辺綾乃博士により製作され、技術提供いただきました。また、本研究で用いたスピニングディスク式スキャナは横河電機の中山博史様から技術提供いただきました。深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Lichtman, J.W. and Conchello, J.A.: *Nat. Methods*, **2**, 910–919 (2005)
- 2) Conchello, J.A. and Lichtman, J.W.: *Nat. Methods*, **2**, 920–931 (2005)
- 3) Denk, W., Strickler, J.H. and Webb, W.W.: *Science*, **248**, 73–76 (2014)
- 4) Nemoto, T.: *Mol. Cells*, **26**, 113–120 (2008)
- 5) Spence, D.E., Kean, P.N. and Sibbett, W.: *Optics Letters*, **16**, 42–44 (1991)
- 6) Kawakami, R., Sawada, K., Sato, A., Hibi, T., Kozawa, Y., Sato, S., Yokoyama, H. and Nemoto, T.: *Sci. Rep.*, **3**, 1014 (2013)
- 7) Kawakami, R., Sawada, K., Kusama, Y., Fang, Y.-C., Kanazawa, S., Kozawa, Y., Sato, S., Yokoyama, H. and Nemoto, T.: *Biomed. Opt. Express*, **6**, 891–901 (2015)
- 8) Ipponjima, S., Hibi, T., Kozawa, Y., Horanai, H., Yokoyama, H., Sato, S. and Nemoto, T.: *Microscopy*, **63**, 23–32 (2014)
- 9) Otomo, K., Hibi, T., Kozawa, Y., Kuruhara, M., Hashimoto, H., Yokoyama, H., Sato, S. and Nemoto, T.: *Opt. Express*, **22**, 28215–28221 (2014)
- 10) Otomo, K., Hibi, T., Murata, T., Watanabe, H., Kawakami, R., Nakayama, H., Hasebe, M. and Nemoto, T.: *Anal. Sci.*, **31**, 307–313 (2015)
- 11) Hell, S.W.: *Science*, **316**, 1153–1158 (2007)
- 12) Otomo, K., Hibi, T., Kozawa, Y. and Nemoto, T.: *Microscopy*, **64**, 227–235 (2015)
- 13) Huang, B., Bates, M. and Zhuang, X.: *Ann. Rev. Biochem.*, **78**, 993–1016 (2009)
- 14) Chen, B.-C., Legant, W.R., Wang, K., Shao, L., Milkie, D.E., Davidson, M.W., Janetopoulos, C., Wu, X.S., Hammer, J.A., Liu, Z., English, B.P., Mimori-Kiyosue, Y., Romero, D.P., Ritter, A.T., Lippincott-Schwartz, J., Fritz-Laylin, L., Mullins, R.D., Mitchell, D.M., Bembenek, J.N., Reymann, A.C., Böhme, R., Grill, S.W., Wang, J.T., Seydoux, G., Tulu, U.S., Kiehart, D.P. and Betzig, E.: *Science*, **346**, 1257998 (2014)
- 15) Hell, S.W. and Wichmann, J.: *Opt. Lett.*, **19**, 780–782 (1994)
- 16) Klar, T.A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A. and Hell, S.W.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 8206–8210 (2000)
- 17) Moneron, G. and Hell, S.W.: *Opt. Express*, **17**, 14567–14573 (2009)
- 18) Takasaki, K.T., Ding, J.B. and Sabatini, B.L.: *Biophys. J.*, **104**, 770–777 (2013)
- 19) Bethge, P., Chéreau, R., Avignone, E., Marsicano, G. and Nägerl U.V.: *Biophys. J.*, **104**, 778–785 (2013)
- 20) Gould, T.J., Burke, D., Bewersdorf, J. and Booth, M.J.: *Opt. Express*, **20**, 20998–21009 (2012)
- 21) Kusama, Y., Tanushi, Y., Yokoyama, M., Kawakami, R., Hibi, T., Kozawa, Y., Nemoto, T., Sato, S. and Yokoyama, H.: *Opt. Express*, **22**, 5746–5753 (2014)
- 22) Fan, G.Y., Fujisaki, H., Miyawaki, A., Tsay, R.K., Tsien, R.Y. and Ellisman, M.H.: *Biophys. J.*, **76**, 2412–2420 (1999)
- 23) Murata, T., Sano, T., Sasabe, M., Nonaka, S., Higashiyama, T., Hasegawa, S., Machida, Y. and Hasebe, M.: *Nat. Commun.*, **4**, 1967 (2013)
- 24) Fujita, K., Nakamura, O., Kaneko, T. and Takamatsu, T.: *Opt. Comm.*, **174**, 7–12 (2000)
- 25) Shimozawa, T., Yamagata, K., Kondo, T., Hayashi, S., Shitamukai, A., Konno, D., Matsuzaki, F., Takayama, J., Onami, S., Nakayama, H., Kosugi, Y., Watanabe, T., Fujita, K. and Mimori-Kiyosue, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 3399–3404 (2013)
- 26) Ogata, S., Miki, T., Seino, S., Tamai, S., Kasai, H. and Nemoto, T.: *PLoS One*, **7**, e37048 (2012)