

SPoD-ExPAN 超解像イメージング

Super-Resolution Imaging by SPoD-ExPAN

和沢 鉄一, 新井 由之, 永井 健治

Tetsuichi Wazawa, Yoshiyuki Arai and Takeharu Nagai

大阪大学産業科学研究所

要旨 SPoD-ExPAN は、偏光方向が周期的に回転する照明光を用いた蛍光顕微鏡と画像再構成計算を組み合わせた超解像イメージング技術である。その主たる特徴は、2次元検出器を利用して広視野の画像を取得するためサブ秒以下の時間分解能でイメージングが可能でありながら、100 nm 以下の空間分解能を達成している点である。SPoD-ExPAN を含む従来の多くの超解像イメージング技術では、0.1 kW/cm²-1 GW/cm² の強い照明光が用いられることから、生細胞に対する光毒性や蛍光プローブの褪色等が問題であった。そこで我々は、近年開発した高速・ポジティブ型光スイッチング蛍光タンパク質 Kohinoor を SPoD-ExPAN と組み合わせることで、~1 W/cm² の非常に弱い照明光強度で観察可能な超解像イメージングを実現し、これらの問題を解決した。本稿では、SPoD-ExPAN の原理、実装、そして実施例について報告する。

キーワード：蛍光変調, 蛍光偏光, 生体適合性イメージング, 光スイッチング蛍光タンパク質, 正則最尤法

1. はじめに

SPoD-ExPAN (super-resolution by polarization demodulation/excitation polarization angle narrowing) は、特有の偏光照明蛍光顕微鏡と正規化画像再構成計算を組み合わせた超解像イメージング法である¹⁾。これは、試料中の蛍光色素の配向角に依存した蛍光強度の変調を広視野顕微鏡で撮影し、再構成計算を経て超解像画像を得るものである(図1)。Hafiらは、固定化細胞のSPoD-ExPAN観察において40 nmの空間分解能を達成した¹⁾。しかし、彼らの方法では、励起状態にある蛍光色素を枯渇させるのに誘導放出^{注1)}を利用したため、1.7 MW/cm²という非常に強い照明光を照射している。強い光の照射下では蛍光試料の褪色や細胞に対する光毒性が顕著に起こるため、Hafiらの方法は生きた細胞や組織の超解像観察には適さない。

そこで、我々は、弱い照明光でも高速で光スイッチング可能な蛍光タンパク質であるKohinoor²⁾を蛍光プローブとして利用することで、SPoD-ExPAN法が抱える問題点を克服した。本稿では、SPoD-ExPAN法の原理、顕微鏡の実装、そして我々が取り組んでいる生細胞の超解像イメージングの実施例³⁾について報告する。

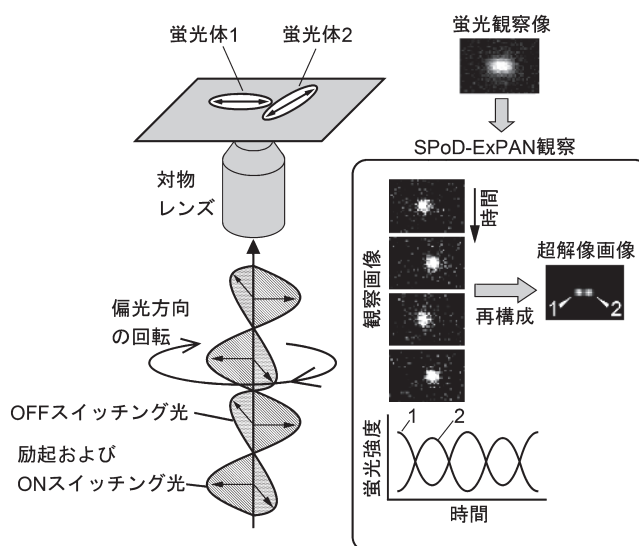


図1 SPoD-ExPAN 超解像イメージングの概要

2. SPoD-ExPAN 法の原理と観察方法

2.1. 偏光の向きを回転させた励起光による蛍光変調の発生
 蛍光色素や蛍光タンパク質は励起光を効率よく吸収する向き(吸収遷移双極子モーメント)を持つ。吸収遷移双極子モーメントと励起光の偏光方向とが平行に近いほどよく励起光が吸収されて蛍光は明るく、直交に近いほど暗くなる。吸収遷移双極子モーメントと直線偏光励起光の偏光方向とのなす角を θ とすれば、その蛍光強度は $\cos^2\theta$ に比例する(図2A)⁴⁾。

さらに、励起光の偏光方向を回転させながら蛍光色素に照

〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘8-1
 TEL: 06-6879-8481; FAX: 06-6875-5724
 E-mail: ngl@sanken.osaka-u.ac.jp
 2017年6月9日受付, 2017年7月5日受理

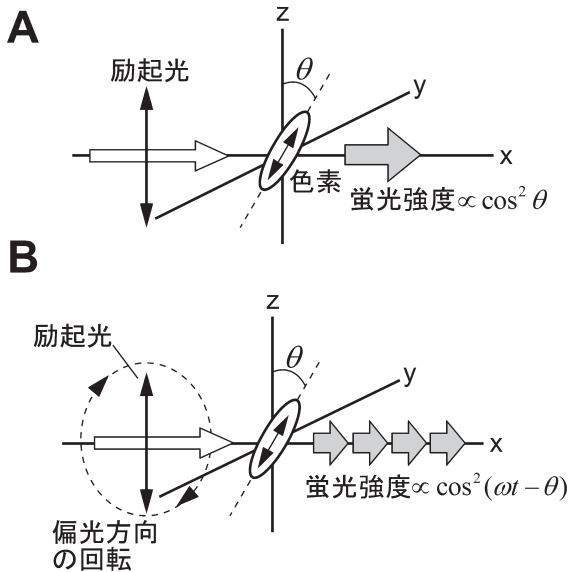


図2 励起光の偏光方向と色素の配向の立体配置. (A) 励起光と色素の吸収遷移双極子モーメントとのなす角の定義. (B) 励起光の偏光方向の回転と、それに伴う蛍光変調発生の様式図.

射することにする (図2B). 励起光の偏光方向と蛍光色素の吸収遷移双極子モーメントとのなす角は周期的に変化し、その蛍光は明滅する. すなわち、励起光の偏光方向の回転の角速度を ω とすると、その蛍光強度は $\cos^2(\omega t - \theta)$ にしたがって時間変化する蛍光変調が発生する. ここで、位相に含まれている θ は、蛍光色素の配向角に起因するものである (図2B).

2.2. 光スイッチング蛍光タンパク質

光スイッチング蛍光タンパク質は、ある波長の光照射により蛍光発光する状態 (ON 状態) へ遷移し (ON スwitching)、別の波長の光で蛍光発光しない状態 (OFF 状態) へ遷移する (OFF スwitching). SPoD-ExPAN 法では、励起光の照射によって ON スwitching が起こるポジティブスitching 型蛍光タンパク質が用いられる. 後述の実施例で用いた Kohinoor もこのタイプに含まれる.

2.3. 互いに直交する直線偏光からなる励起光とスイッチング光の同時照射による蛍光変調の増強

光スイッチング蛍光タンパク質のスイッチング速度には偏光依存性がある. スwitching 光の偏光方向とその吸収遷移双極子モーメントとのなす角を ϕ とすると、スitching 速度は $\cos^2\phi$ に比例する. この依存性は励起光の偏光に対する蛍光強度の依存性と同様である. Kohinoor については、ON 状態における励起光および OFF スwitching 光の吸収遷移双極子モーメントは互いにほぼ平行である⁵⁾. それらと、OFF 状態における ON スwitching 光の吸収遷移双極子モーメントの間には、蛍光発色団の異性化やコンフォメーション変化によって、多少の角度差があるかもしれない. しかし、ここでは近似として、励起光、OFF スwitching 光、そして ON スwitching 光の吸収遷移双極子モーメントの向きは同じだと仮定する.

励起・ON スwitching 光と OFF スwitching 光の偏光方向が直交した状態で偏光方向が周期的に回転する照明光を、1 個の蛍光タンパク質に照射する状況を考察する (図3). 励起・ON スwitching 光の偏光方向が蛍光タンパク質の吸収遷移双極子モーメントに対して平行に近づくにしたがって (図3A), ON スwitching が促進し、さらに励起も促進する. しかも、OFF スwitching 光の偏光方向は吸収遷移双極子モーメントに対して直交に近づくため、OFF スwitching は起こらなくなる. したがって、強い蛍光が発生する. さらに偏光の回転が進み、励起・ON スwitching 光の偏光方向と吸収遷移双極子モーメントとが直交に近づくにしたがって (図3B), ON スwitching や励起は起こらなくなる. しかも、OFF スwitching 光の偏光方向は吸収遷移双極子モーメントに対して平行に近づくので、OFF スwitching が促進する. このようにして、蛍光発生が強制的に低減される.

蛍光タンパク質の吸収遷移双極子モーメントの方位角を 0° とし、励起・ON スwitching 光の偏光の方位角を θ (OFF スwitching 光の偏光方位角は $\theta - 90^\circ$) とすると、その蛍光強度の θ 依存性は、

$$f(\theta) = \frac{\cos^4 \theta}{\cos^2 \theta + \frac{k_{\text{OFF}}}{k_{\text{ON}}} \cos^2(\theta - 90^\circ)} \quad (1)$$

となる. ただし、式 (1) では、ON, OFF スwitching 速度は、角度 θ の変化速度より十分速いと仮定している. もしも OFF スwitching 光がなければ $k_{\text{OFF}} = 0$ であり、応答関数 $f(\theta)$ は励起光のみの場合 (図2A) と同じである. 一方、 $k_{\text{OFF}}/k_{\text{ON}}$ 比が大きくなるにしたがって、 $f(\theta)$ のピークが鋭くなり (図3C), 吸収遷移双極子モーメントの向きが互いに異なる近接した蛍光タンパク質同士の区別が可能になる. 図3Dに、式 (1) で計算された2 個の蛍光タンパク質からの蛍光応答例を示す. 励起光のみの場合、2 個の蛍光タンパク質の蛍光変調の重なりは、1 個の蛍光変調と区別がつかない (図3D, 下段)^{註2)}. しかし、ON/OFF スwitching が起これば、2 個の蛍光タンパク質の蛍光変調の重なりの中からピークが別々に現れ、分離検出が可能になる (図3D, 上段).

2.4. 超解像画像の再構成計算

超解像再構成計算は、取得画像データに基づいて試料面上の蛍光色素の空間分布を推定するものであり、この空間分布が超解像画像である. 特に、SPoD-ExPAN 法では、「観察に用いた顕微鏡光学系の点像分布関数と超解像画像との畳み込み画像と実測画像とができるだけ似るような、超解像画像を推定する」という逆問題を解く計算を行っている. このアルゴリズムには正規化最尤推定が用いられていて、適切解への収束を誘導するための正則項と尤度関数項との和を評価関数とした最適化計算を行うことで、適切解への収束を得るようになっている. 評価関数は、以下の項の和としている:

(1) 点像分布関数と超解像画像との畳み込み画像と、実測の

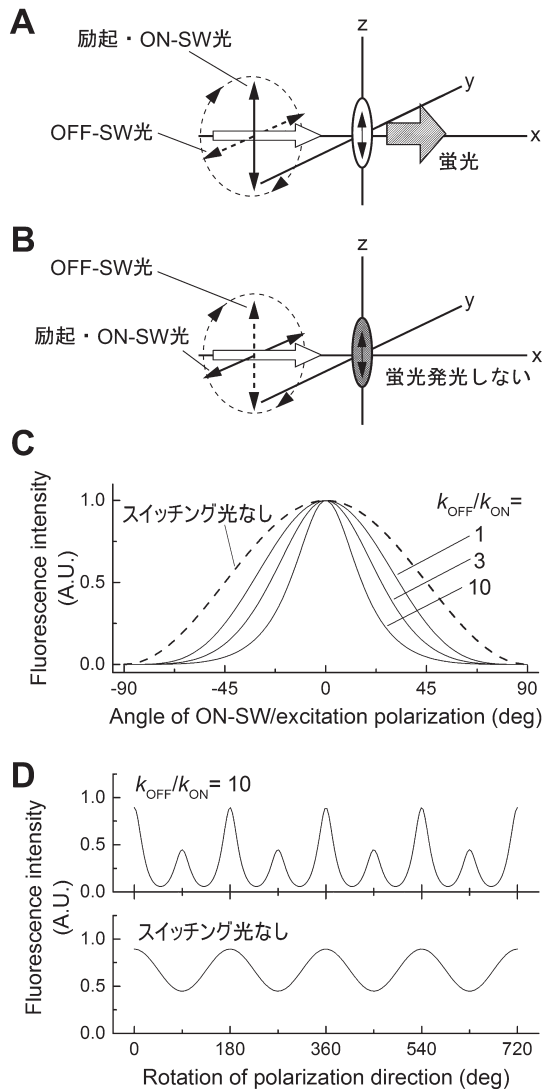


図3 励起・ONスイッチング (ON-SW) 光, OFFスイッチング (OFF-SW) 光による効果. (A, B) 励起・ONスイッチング光の偏光方向が蛍光タンパク質の吸収遷移双極子モーメントと (A) 平行な状態と (B) 直交した状態. (C) 照明光を配向角 0° の蛍光タンパク質に照射したときの蛍光の偏光方位角応答. 式(1)により計算した. (D) 照明光の偏光角を回転させながら2個の蛍光タンパク質に照射したときの, 蛍光応答の例. 蛍光強度の異なる近接した2個の蛍光タンパク質 (蛍光強度比, 2:1) において, 式(1)を用いて, 蛍光応答を $0.89f(\theta) + 0.45f(\theta + 90^\circ)$ と表して, $k_{\text{OFF}}/k_{\text{ON}} = 10$ (上段) およびスイッチング光なし (下段) の計算結果をプロットした.

蛍光変調を含む撮影画像データとの類似性を評価する尤度関数項

- (2) 超解像画像上の蛍光強度の総和が小さくなる方向に解を誘導する正則項
- (3) 実測画像データに含まれているバックグラウンド強度の空間分布が滑らかになる方向に解を誘導する正則項

Hafiらの論文¹⁾の Supporting Material において, Python で書かれた超解像再構成計算用プログラムが提供されている.

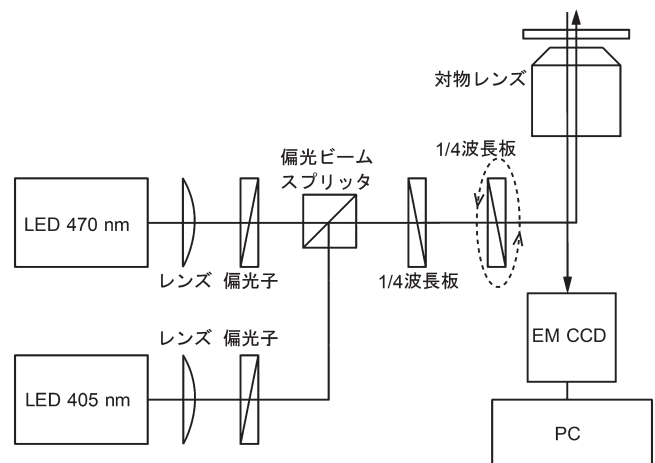


図4 KohinoorのSPoD-ExPAN超解像イメージングのための顕微鏡装置のブロック図. この顕微鏡装置に特徴的な光学素子のみ示し, 落射蛍光顕微鏡で一般的に用いられている光学素子類は省略している.

これは, 観察で得られたタイムラプス画像と, 点像分布関数としての微小蛍光物体の撮影画像を入力データとして再構成計算を行う.

3. 光スイッチング蛍光タンパク質 Kohinoor を使った実施例

3.1. SPoD-ExPAN 顕微鏡の実装

本実施例の顕微鏡は, 落射蛍光顕微鏡に, 励起・ONスイッチング光と OFF スwitching 光の偏光方向を回転させるための機構を加えて構築した (図4). この装置は2台のLED光源を用いており^{注3)}, 中心波長405 nmのLEDはOFFスイッチング用, 中心波長470 nmのものは励起およびONスイッチング用である. 各光源からの光をレンズでコリメートし, 偏光子に通して互いに直交する直線偏光成分を抽出した. これらの二本のビームを広帯域偏光ビームスプリッターに入射し, 重ね合わせて1本のビームにした. このビームを第1の1/4波長板に入射することで円偏光に変換し, 次いで中空軸モーターのシャフト内に埋め込んだ第2の1/4波長板を通して, 直線偏光に戻した. 中空軸モーターによって第2の1/4波長板を回転させることで, 互いに直交する405 nmと470 nmの光の偏光方向を同時に回転させた^{注4)}. このビームを落射蛍光顕微鏡の照明光学系へ導入し, 試料に照射した. カメラの露光は中空軸モーターの回転と同期させ, 照明光の偏光の回転が一定角度進むごとに像を撮影した^{注5)}.

3.2. 生細胞のSPoD-ExPAN超解像イメージング

中間径フィラメントの構成タンパク質である vimentin と Kohinoor との融合タンパク質 (Kohinoor-vimentin) を発現するベクター^{注5)}をヒト由来の HeLa 細胞に導入した. 細胞中で発現した Kohinoor-vimentin は, 中間径フィラメントの重合の際にその中に取り込まれる. このようにして, 中間径フィラメントを Kohinoor で蛍光標識した.

図 5A には、通常の落射蛍光顕微鏡モードで撮影した中間径フィラメントの蛍光像を示す。この場合、光の回折限界を含む顕微鏡結像光学系の点像分布関数の幅が反映し、画像に映っているフィラメント像の幅は 250 nm 以上となった (図 5C, 上段)。なお、電子顕微鏡による測定から、HeLa 細胞中の中間径フィラメントの実際の直径は 10 nm 程度と報告されている⁶⁾。

図 5A と同じ細胞を SPoD-ExPAN 法で観察し、再構成計算で得られた超解像画像が図 5B である。ここでは、励起・ON スwitching 光、OFF スwitching 光とも、 1.3 W/cm^2 のパワー密度で観察を行った。中間径フィラメント像の幅は典型的には半値幅で 80 nm であったことより (図 5C, 下段)、Rayleigh 基準に相当する分解能値は 70 nm と見積もられた。我々の実施例で 1.3 W/cm^2 という極めて弱いパワー密度の

照明光で超解像イメージングを実現したことは特筆すべき点である。これとは対照的に、以前の SPoD-ExPAN 観察では 1.7 MW/cm^2 という膨大なパワー密度の光が用いられた¹⁾。また、従来の超解像イメージング法である RESOLFT や SMLM (single molecule localization microscopy) でも、一般的に強いパワー密度の照明光が必要である (0.1 kW/cm^2 – 1 GW/cm^2)⁷⁾。強い光の照射は生きた細胞に対して光毒性を発生させることが知られており⁸⁾、超解像イメージングにおける光毒性の発生は深刻な問題となっている。以上より、Kohinoor を使った SPoD-ExPAN イメージングは、細胞や組織を生きたまま経時的に超解像観察する技術として今後のバイオイメージングでの活用が期待される。

4. 今後の展望

これまでの超解像顕微鏡技術の開発によって、細胞内の精細な構造を可視化できるようになった。今後、超解像顕微鏡技術が生物学上の諸問題を解明するためのツールとして活躍していくには、生体試料に対するダメージが少ないことに加えて、細胞内の構造だけではなく酵素反応や情報伝達、そして熱といった質的な空間分布とダイナミクスの可視化が必要になってくるだろう。そのために、顕微鏡のハードウェア開発およびプローブ開発の両方のより一層の進展を期待したい。

謝 辞

本稿で紹介した SPoD-ExPAN 超解像イメージングの実施例の一部は、JST CREST (JPMJCR15N3)、科学研究費補助金 (23115003, 16K07322) の助成を受けて行った。また、SPoD-ExPAN 顕微鏡光学系製作では株式会社オプトラインにご協力を頂いた。ここに深く謝意を表す。

注

注 1) 励起状態の蛍光色素にある波長の光を照射すると、この色素が同じ波長・同じ位相の光を放出して基底状態に戻ることを誘導放出という。STED 顕微鏡や STED を用いる SPoD-ExPAN は、誘導放出光照射下の蛍光色素を基底状態へ飽和させることで、励起状態の色素を枯渇させるプロセスを利用している。

注 2) 初等数学で学ぶとおり、同じ角速度 ω で振動する複数の三角関数項の和は、同じ角速度 ω を持つ 1 つの三角関数項で表せる。したがって、スウィッチング光なしで、偏光方向が回転する励起光のみの照明では、近接した色素の分離・検出の感度は低い。

注 3) 本稿では、LED 光源を用いた実施例を示しているが、レーザーを光源として使っても実装可能である。

注 4) 直線偏光の偏光面を、波長板を 1–10 回転/s 程度の速度で回転させる。すなわち、ここで使っている偏光は、円偏光ではない。

注 5) 中空軸モーターとしては、ステッピングモーターよりも、振動の少ないサーボモーターの方が適当である。我々は、照明光の偏光面の回転とカメラ撮影を同期させるため、ロータリーエンコーダー付きのサーボモーターを使っている。ロータリーエンコーダーからの電気信号 (A 相または B 相) をパルス分周変換し、カメラ撮影の露光トリガーとして用いた。

注 6) 我々は、Kohinoor と様々な細胞内タンパク質との融合タンパク質を発現するためのベクターを構築しており²⁾、その一部は DNA

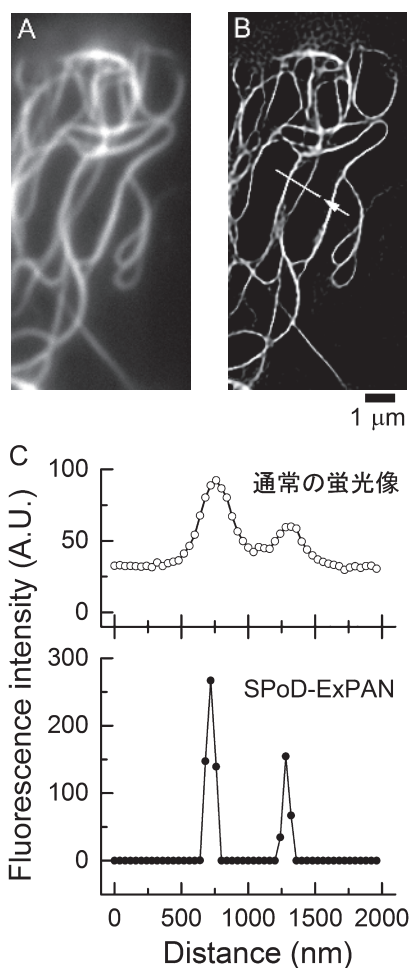


図 5 Kohinoor と SPoD-ExPAN による、生きた HeLa 細胞中の中間径フィラメントの超解像イメージング。(A) 落射蛍光顕微鏡による、Kohinoor 標識中間径フィラメントの蛍光像。(B) (A) と同じ視野位置における、SPoD-ExPAN 超解像画像。1 枚の超解像画像を再構成するのに用いる画像データとして、照明光の偏光方向を 4 s かけて 360° 回転させる間に、18 枚の蛍光像を撮影した。各撮影の露光時間は 0.1 s とした。(C) パネル (B) 中の矢印で示した部分の、落射蛍光顕微鏡像と SPoD-ExPAN 超解像画像のラインプロファイル。

Repository の Addgene (<http://www.addgene.org>) を介して提供している。これらの発現ベクターを使うことにより、細胞骨格、細胞接着斑、ミトコンドリア、ゴルジ体、細胞核等の観察が可能である。

文 献

- 1) Hafi, N., Grunwald, M., van den Heuvel, L.S., Aspelmeier, T., Chen, J.-H., Zagrebelsky, M., Schütte, O.M., Steinem, C., Korte, M., Munk, A. and Walla, P.J.: *Nat. Methods*, **11**, 579–584 (2014)
- 2) Tiwari, D.K., Arai, Y., Yamanaka, M., Matsuda, T., Agetsuma, M., Nakano, M., Fujita, K. and Nagai, T.: *Nat. Methods*, **12**, 515–518 (2015)
- 3) Wazawa, T., Arai, Y., Takauchi, H., Tiwari, D. and Nagai, T.: *Micoscopy (Oxford)*, Vol. 64, Suppl. 1, i137 (2015)
- 4) Lakowicz, J.R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, 353–382 (2006)
- 5) Ansbacher, T., Srivastava, H.K., Stein, T., Baer, R., Merx, M. and Shurki, A.: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **14**, 4109–4117 (2012)
- 6) Wickert, U., Mücke, N., Wedig, T., Müller, S.A., Aebi, U. and Herrmann, H.: *Eur. J. Cell Biol.*, **84**, 379–391 (2005)
- 7) Eggeling, C., Willig, K.I., Sahl, S.J. and Hell, S.W.: *Q. Rev. Biophys.*, **48**, 178–243 (2015)
- 8) Magidson, V. and Khodjakov, A.: *Method. Cell Biol.*, **114**, 545–560 (2013)