

平成26年12月1日発行(毎月1回1日発行)通巻763号 昭和15年4月18日第3種郵便物認可 CODEN:KAKYAU ISSN 0451-1964

C H E M I S T R Y

化学

DECEMBER
2014
Vol.69

12

特別解説 • Special reviews

ノーベル賞を読み解く

2014年 化学賞, 生理学・医学賞, 物理学賞

解説 • Research article

単一キラリティーの カーボンナノチューブ合成!

連載講座 • Serial lecture

有機化学の
新たな指導原理 **有機軌道論** ⑨

6 おかげ
さまで
SINCE 1954

2014年ノーベル賞を読み解く 化学賞

回折限界を超えた超解像蛍光顕微鏡

——“物理”の限界を超え“生命”科学の進展に貢献

永井健治

大阪大学産業科学研究所

従来の光学顕微鏡では不可能であった、ナノメートル(10億分の1メートル)の空間スケールを垣間見ることが可能にし、生きた細胞内の微小構造の“動態”に関する理解への貢献が期待される超解像蛍光顕微鏡がなぜ、ノーベル“化学”賞に値するのか？そして今後どのようなサイエンスが展開されようとしているのかを概説する。

2014年のノーベル化学賞は、アメリカのハーワードヒューズ医学研究所のEric Betzig博士、スタンフォード大学のWilliam E. Moerner博士、ドイツ・マックスプランク研究所のStefan W. Hell博士の3氏に授与されることが決まった。受賞理由は「超解像蛍光顕微鏡の開発」である。長年、物理法則によって光の波長の半分の大きさよりも小さなものは見ることができないとされてきた。私たちが見ることのできる可視光の波長は400～700nmであることから、最も短い波長を用いても200nmより細かい構造を解像することはできないと信じられていた。しかしながら3氏は、蛍光分子の特性を巧みに用いることで、この限界を超えることに成功したのである。

このブレイクスルーによって、光学顕微鏡の観察対象は μm (マイクロメートル)からnm(ナノメートル)のオーダーに広がり、とくに生体試料の観察に導入され威力を発揮している。“物理”法則を打ち破り、“生命”科学の進展に貢献している技術開発に対してノーベル“化学”賞が授与されたことは

ながい・たけはる ● 大阪大学産業科学研究所教授、1998年東京大学大学院医学系研究科博士課程修了、＜研究テーマ＞バイオイメーjing、＜趣味＞読書、登山、スキー、飲酒しながらの科学談義

きわめて興味深い。ここでは何が空間分解能を制限しているのかを簡潔に解説し、3氏がいかにしてその制限を克服したのか、さらに今後どのようなサイエンスが展開されつつあるのかを述べる。

回折限界とは？

細胞のように小さすぎて肉眼では見えないモノは、顕微鏡を使い像を拡大して観察するのが一般的である。この像の拡大は千倍、一万倍、百万倍……といくらでも原理的には可能だが、実際、ある程度以下の小さな構造はどれだけ拡大して

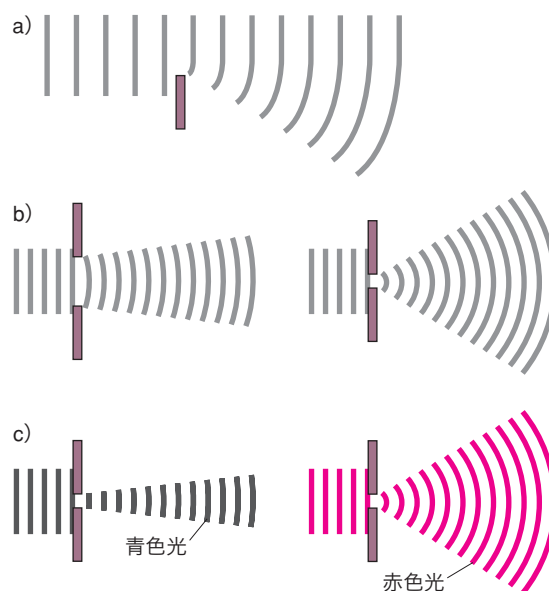


図1 光の回折現象

a) 平面波が障害物にぶつかると、光は折れ曲がる。b) スリットの径が小さいほど回折角は大きくなる。c) 赤色光(波長が長い光)のほうが、青色光(波長が短い光)よりも回折角が大きくなる。

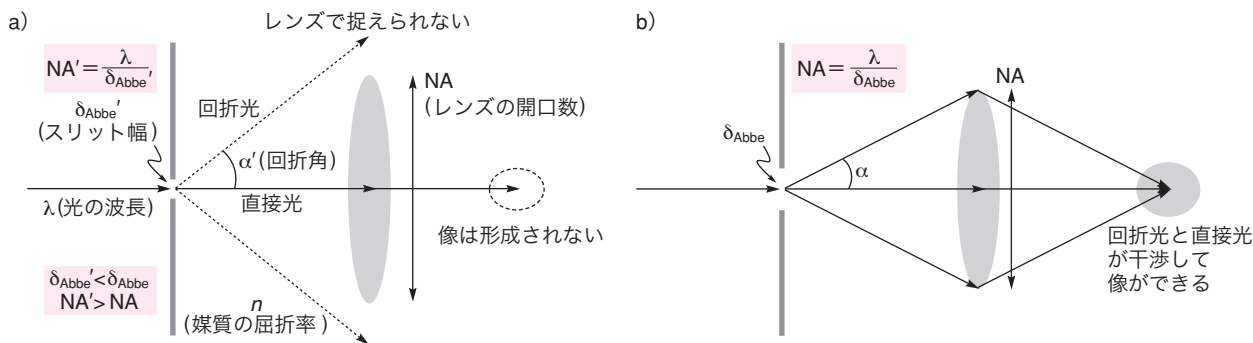


図2 回折光がレンズによって結像するしくみ
a) レンズの回折限界, b) Abbeが定義した空間分解能.

も、ボケた像が大きくなるだけで、その構造の詳細は見えてこない。可視光を用いて観察する場合は、200 nm程度の大きさのモノを解像するのが限界である。なぜなら、光が“回折”という物理現象を生じる波の性質をもっているからである。

光の回折とは、平面波（たとえば、太陽からやってくる平行に進む光など）が障害物にぶつかったとき、その裏側に回り込む結果、折れ曲がってしまう現象のことである（図1a）。光が狭い隙間（スリット）を抜けると、回折によって平面波から球面波に変化する（図1b, c）。このとき、スリットの径が小さいほど（図1b）、また波長が長いほど（図1c）、折れ曲がる角度（回折角）が大きくなることが知られている。細胞をはじめとする観察対象はさまざまな大きさをもつスリットの集合体とみなすことができ、それぞれの大きさのスリットをくぐり抜けて球面波になった光をレンズで捉えて、集光させる

ことで像が形成される。このとき、構造が細かく（つまりスリット幅が狭い）、観察に使う光の波長が長いほど大きく回折してしまい、レンズで捉えることができなくなるため像の形成に寄与できなくなり、結果として細かな構造は見えなくなってしまう（図2a）。これを、レンズの“回折限界”という。したがって、回折効果が少ない短い波長や大きな回折角を捉えることが可能なレンズを用いれば、より細かな構造が見えるようになるはずだが、これにも限界がある。

このレンズの回折限界を定式化したのがErnst Abbe（1840-1905）であり、19世紀後半のことである。Abbeは、回折光がレンズによって捉えられるか否かで結像できるかどうかが決まることから、レンズによって捉えられる最小のスリット幅（ δ_{Abbe} ）として空間分解能を以下のように定義した（図2b）。

受賞者略歴 | 『化学』編集部調べ



Eric Betzig (エリック・ベツィグ)
ハーワードヒューズ医学研究所グループリーダー。1960年アメリカ生まれ。カリフォルニア工科大学で物理学を学び、1983年に学士号を取得したあと、1988年にコーネル大学において応用物理・基礎工学でPh.D.を取得。その後、AT&Tベル研究所の技術スタッフ、企業の研究員を経て、2005年よりハーワードヒューズ医学研究所のグループリーダーとなり、現在に至る。

Stefan W. Hell (シュテファン・ヘル)
マックスプランク生物物理化学研究所所長、ゲッティンゲン大学名誉教授、ハイデルベルグ大学非常勤教授。
1962年ルーマニア生まれ。ハイデルベルグ大学で1987年に物理学の学士号、1990年にPh.D.を取得。その後、1991～1993



年ヨーロッパ分子生物学研究所にて博士研究員、1993～1996年フィンランドのトゥルク大学で主任研究員を経て、1997年にマックスプランク生物物理化学研究所へ移り、2002年から同研究所の所長に就任し、現在に至る。

William E. Moerner
(ウィリアム・モナー)
スタンフォード大学教授。

1953年アメリカ生まれ。ワシントン大学で物理学、電気工学、数学を学び、1975年に学士号を取得後、コーネル大学にて1982年に物理学でPh.D.を取得。1981～1993年IBMアルマデン研究センターで研究員、マネージャー、プロジェクトリーダーを勤め、1993～1994年スイス連邦工科大学チューリッヒ校の客員教授、その後再びIBMアルマデン研究センターに移り、1995～1998年カリフォルニア大学サンディエゴ校を経て、1998年にスタンフォード大学教授に就任し、現在に至る。



PHOTO: Stanford University

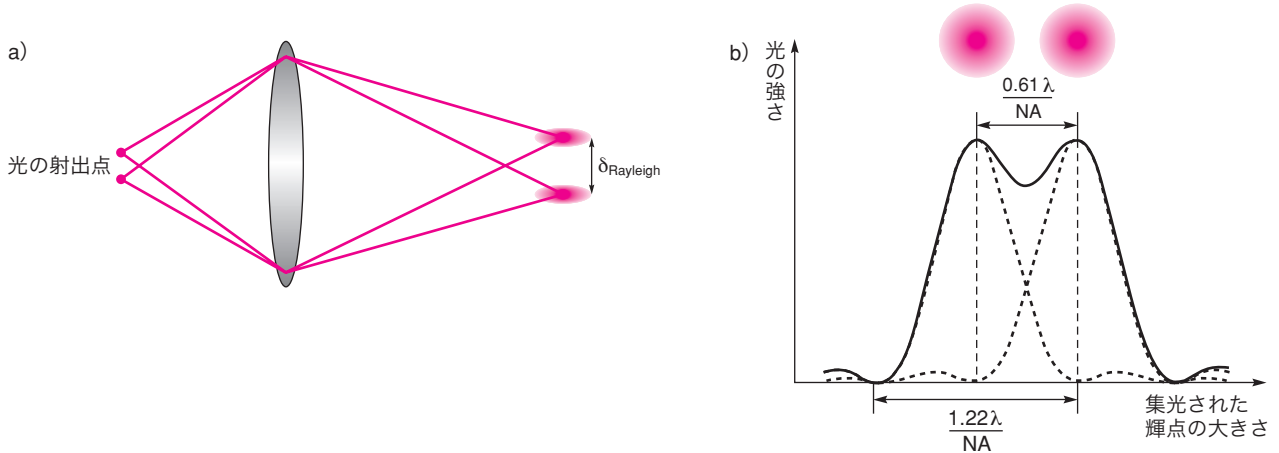


図3 Rayleighが見いだした空間分解能の定義

a) 無限小の点から発した光がレンズを通して結像する様子, b) 二つの像を区別する最小の距離 δ_{Rayleigh} を表すグラフ。

$$\delta_{\text{Abbe}} = \frac{\lambda}{\text{NA}} \quad (1)$$

$$\delta_{\text{Rayleigh}} = \frac{0.61\lambda}{\text{NA}} \quad (3)$$

ここで λ は光の波長, NA (numerical aperture) はレンズの開口数で, どれだけ大きく回折した光を捉えることができるかを表す. NA は物体からレンズに入射する光線の光軸に対する最大角度を α , 物体とレンズのあいだの媒質の屈折率を n として, 次のように表される.

$$\text{NA} = n \cdot \sin \alpha \quad (2)$$

その後, Lord Rayleigh (1842-1919) は「近接した2点から射出された光がレンズを通過して再度2点に集光するとき, それぞれの2点はある程度の広がりをもつ円形の回折像になるが, この二つの像を区別できる最小の距離 δ_{Rayleigh} は, ちょうど二つの円の中心が相互の半径上に来的时候である」とし, 次の式で表した(図3).

現在市販されている対物レンズの NA は最大でも 1.5 程度であることから, δ は半波長程度となり, 最も短い可視光 (400 nm) を用いても 200 nm 程度が解像できる限界であることがわかる. たとえば, 細菌の大きさがおよそ 1 μm 程度なので, その内部構造は通常の光学顕微鏡ではほとんど解像できない. ウィルスは 100 nm 前後, タンパク質は数 nm 程度なので, それらの解像は理論的に不可能である. この回折限界に基づく空間分解能の定義は 100 年以上にもわたって用いられ, その限界は超えられないと信じられてきた.

1 分子蛍光の超局在による超解像

2008 年のノーベル化学賞受賞で馴染み深いオワンクラゲの緑色蛍光タンパク質 (GFP) は, およそ 3.5 nm 程度の直

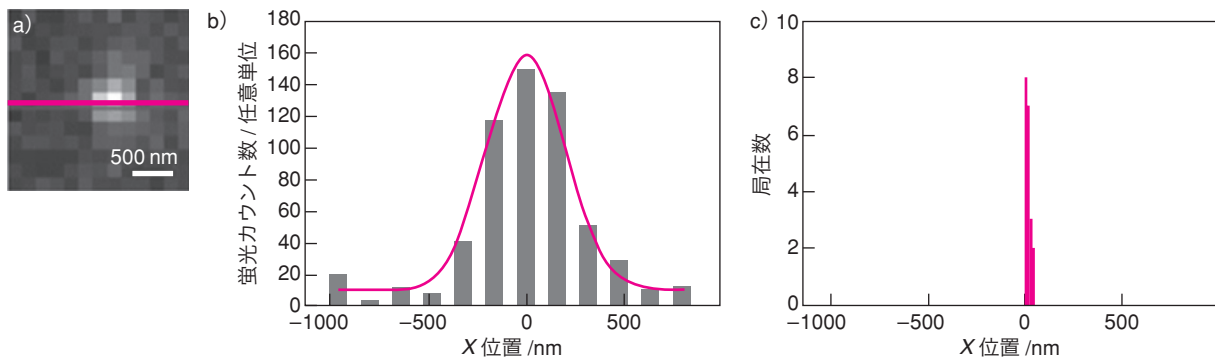


図4 ガウス分布のフィッティングにより求められる重心位置

a) 1 分子蛍光輝点, b) 輝点の断面の蛍光プロファイル, c) 重心位置を決めたあとの輝点の大きさ.

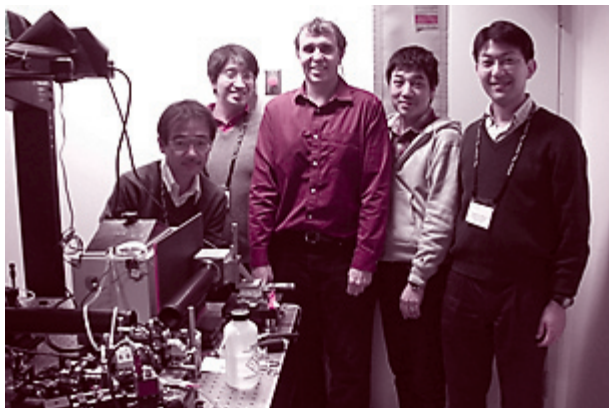


写真1 Eric Betzig 博士の研究室にて

筆者らが2012年にハーワードヒューズ医学研究所にあるBetzig博士の研究室を訪問したとき、お気に入りの真紅のシャツを着た彼に研究室を案内してもらった。左から宮脇敦史博士(理化学研究所)、水野秀明博士(ルーベンカトリック大学)、Betzig博士、筆者、小倉正道博士(埼玉大学)。左手前の光学系は最近改良に力を入れているベッセルビーム顕微鏡。写真提供：小倉正道博士。

径をもつ樽型分子であるが、このGFP 1分子から射出した光(蛍光極大510 nm)を高NAのレンズで捉えて結像すると、像はどの程度ボケてしまうだろうか? NAが1.5程度のレンズを用いると、式(1)から輝点の大きさは340 nmになり、空間分解能もこの程度になると導かれる。しかし、近傍にはほかのGFPが存在せず、1分子のGFPのみからしか光が発していないのであれば、たとえ輝点が340 nmの広がりをもっていたとしても、ガウス分布でフィッティングすることで、その重心位置をnm程度の“精度”で求めることが可能である(図4)。

このことを考慮することで、Rayleighの基準から解放されたれ、空間分解能を向上させることができる、と考えたのがBetzigである(写真1)¹⁾。300 nmの空間のなかに多数のGFP分子が存在したとしても、それらを1個ずつ光らせてその重心位置を求めたのち、すべての重心位置の情報を再描画すれば、Rayleighの空間分解能の定義に煩わされる必要がなくなるわけである。

しかし、これを実現するためには、「1分子からの光を顕微鏡下で捉える」ことができなければならない。考えるまでもなく、たった1分子が発する光はきわめて微弱であるため、その検出は非常に難しい。その微弱な光を捉えることに世界ではじめて成功したのがMoernerである²⁾。この研究が引き金となり、単一分子分光ひいては単一蛍光分子イメージングが大きく発展していくことになった。1995年には全反射蛍光顕微鏡(TIRF Microscopy)を利用することで背景光を劇的に抑え、1分子の蛍光性ATPがミオシンタンパク質に結合

する様子を鮮明に可視化することに柳田らが成功した³⁾。この報告以降、TIRF顕微鏡は1分子蛍光観察の標準機器となる。MoernerはこのTIRF顕微鏡を利用して、GFPの黄色変異体(YFP)の発光特性を単一分子レベルで調べた。その結果、488 nmで励起した場合、蛍光が明滅(プリンキング)すること、および何回かのプリンキングののち、YFP分子が安定した暗状態に入ることを発見した。さらに驚くべきことに、この暗状態のYFP分子に405 nmの光を照射することで、再活性化できることを見いだした(図5)⁴⁾。

これらの結果は新規な光化学特性をもつGFP変異体の探索に大きな道を開き、Lippincott-Schwartzらによる光活性化型GFP(PA-GFP)の開発に至った⁵⁾。PA-GFPは、最初は無蛍光だが、405 nmの照射によって活性化されると、488 nmによる励起で緑色蛍光を発するようになる。このPA-GFPに目をつけたBetzigは、Lippincott-Schwartzと共同研究を開始し、細胞内のタンパク質をPA-GFPやKaede、Eos-FPなどの光活性化型蛍光タンパク質で標識して、以下に示す三つのステップを繰り返し、TIRF顕微鏡で1分子蛍光を観察した。

- ① 回折限界の領域内に存在する複数個の光活性化型蛍光タンパク質のうち、一つだけを活性化できる程度の光強度で刺激光照射を行う。
- ② 輝点のシグナルを十分なS/N比(シグナルとノイズの比

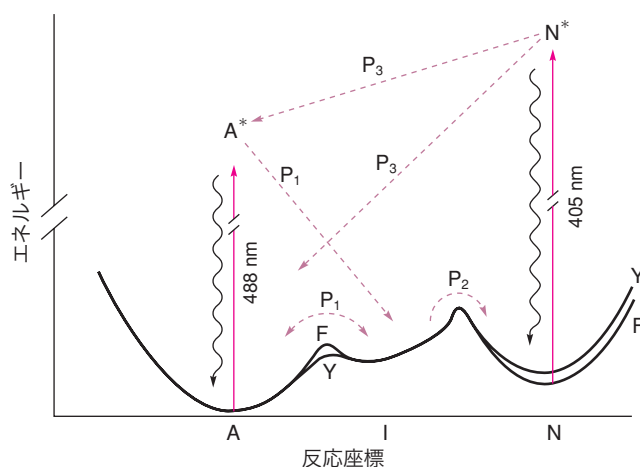


図5 単一YFP分子の遷移状態モデル

YFP分子には明状態(A)、プリンキング状態(I)、光刺激によって暗状態から明状態に遷移が可能な状態(N)の三つの状態が存在する。実験結果からAはYFP発色団がイオン化状態に、Nは非イオン化状態にあると考えられている。P₁は488 nmで励起したときの蛍光プリンキング状態を、P₂は安定した暗状態への遷移を、P₃は405 nmを照射したときの明状態への遷移を示す。*: 励起状態、Y: 203番目のアミノ酸にチロシンをもつYFP変異体、F: 203番目のアミノ酸にフェニルアラニンをもつYFP変異体。

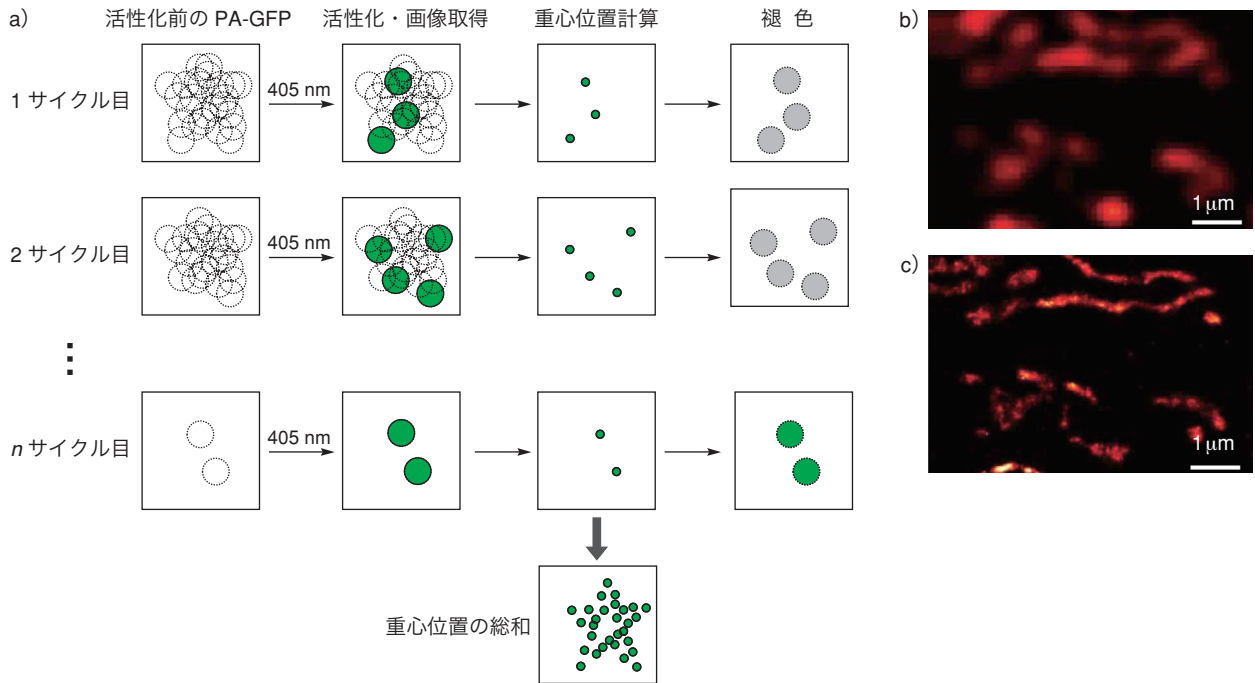


図6 Betzig 博士が開発した PALM 超解像顕微鏡

a) PALM の原理図. PALM は光活性化→画像取得→重心位置計算→褪色の過程を 1 サイクルとして、視野中の蛍光分子がすべて褪色されるまで繰り返し、得られたすべての輝度重心輝点を重ね合わせることで最終画像を得る. b) TIRF 画像. c) PALM 画像. E. Betzig et al., *Science*, **313**, 1624 (2006)より転載. Reprinted with permission from AAAS.

率)が得られる程度の露光時間で取得する.

③最後に蛍光タンパク質を光褪色する.

これら三つのステップを、試料中のすべての蛍光分子が光褪色するまで繰り返し行ったのち、一つひとつの輝点の強度分布からその重心位置を計算する. このような計算によって輝度重心が数 nm 程度の“位置精度”で決定できる. 幅が数百 nm の輝度分布を数 nm の大きさに変換することで、空間分解能を向上させたのである (図 6)⁶⁾. この PALM

(photoactivated localization microscopy) と呼ばれる顕微鏡は、実際にはノイズなどの影響もあって 10 nm 程度の空間分解能に留まっているが、それでも透過型電子顕微鏡像に肉迫した空間分解能を得られることが明らかになった.

光学的な超解像

Betzig は試料をまばらに光らせることで超解像を達成したのに対し、Hell は光学顕微鏡の一種である共焦点蛍光顕微鏡において、蛍光励起の空間パターンを改良することで超

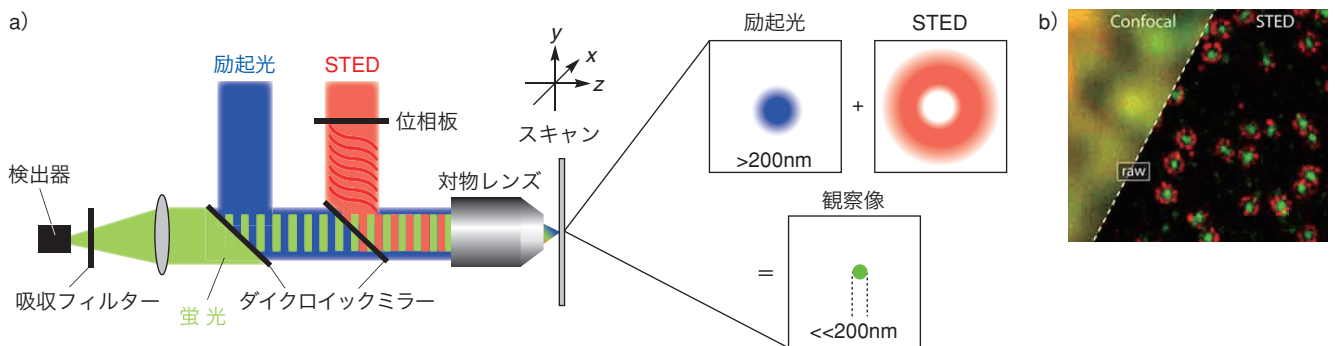


図7 STED 法の模式図

a) 光学系の模式図. 励起光のスポットにドーナツ状の STED ビームを重ね合わせることで、回折限界を超えることができる. b) STED で撮影された超解像写真. S. W. Hell et al., *Biophys. J.*, **105**, L01 (2013)より転載. ©2013 Biophysical Society.



写真2 Hell 博士と超解像顕微鏡の展望について議論する筆者
2013年9月9日、大阪大学産業科学研究所で開催された Hell 博士の講演会において。

解像化を図った。共焦点蛍光顕微鏡は試料の1点に集光したレーザーを走査し、試料上の各点の蛍光強度情報をパソコン画面に再構成して画像をつくる。このとき、上述したように、回折限界以下にレーザー光を絞ることはできないため、直径200 nm程度の領域が照射されることとなり、そこに複数の蛍光分子があるとすべてが励起され光ってしまう結果、Rayleighの基準を超える空間分解能を達成することはできない。そこでHellらは、励起レーザーを取り囲むような、ドーナツ状のレーザー照射を行うことを考案した⁷⁾(図7)。

ここで用いたドーナツ状の光〔STED (stimulated emission depletion) ビーム〕は、誘導放出のための光であり、励起状態にある蛍光分子が自然放出により発光する前に、STEDビームと同じ波長のコヒーレントな光(誘導放出光)を放出して強制的に基底状態へともどす働きがある。誘導放出光を、観察する蛍光分子が発する蛍光スペクトルの長波長領域に設定し、それを適当な吸収フィルターでカットしてやれば、自然放出により発光する分子がより局所に絞られ、空間分解能が向上する。HellらはこのSTED法により50 nm程度の空間分解能を達成した⁸⁾。

この方法の利点として、STEDビームのためのレーザーが1本増えただけで原理的には通常の共焦点顕微鏡と変わらないことや、PALMよりも時間分解能が高いことなどがあげられる。しかしながら、誘導放出させるためにGW(ギガワット)/cm²という莫大なパワー密度のSTEDビームを照射する必要があり、蛍光分子のみならず、試料そのものへの光損傷が懸念されていた。この問題を解決するために、Hellらはより少ない光照射(STED光の1/10⁸)で蛍光のON/OFF制御が可能な光スイッチング蛍光タンパク質を利用するRESOLFT (reversible saturable optical fluorescence

transitions) 法を考案した⁹⁾。光スイッチング蛍光タンパク質としては、宮脇らが開発したDronpaとその誘導体がよく利用されている¹⁰⁾。

以上、二つの超解像法の原理を説明したが、その基本はいずれも蛍光分子の光活性化、光褪色、誘導放出、光スイッチングなど“光化学”特性をおおいに利用することにある。これらの化学的な特性を巧みに用いる発想を思いついたからこそ、“物理”法則を打ち破り、“生命”科学の進展に貢献する技術が開発されたのである。冒頭で「ノーベル“化学”賞が授与されたことはきわめて興味深い」と記述したが、賢明な読者はその妥当性に納得するに違いない。

現在も超解像顕微鏡に関する技術開発は、日進月歩の勢いで進んでいる。そう遠くない将来に、生きた試料を10 ms/10 nm程度の時空間分解能で観察できるようになると予想される。しかしながら、超解像顕微鏡を用いた解析のほとんどが図7(b)にあるような「生きた細胞内で電子顕微鏡レベルの細かい構造が見えましたよ」という結果ばかりであり、生命科学上の大発見がなされたという話はいまだに聞かない。

2013年9月9日にHell博士が大阪大学産業科学研究所を訪れた際に、そのことについて彼と議論したが、同じ意見であった(写真2)。時空間分解能がよくなるだけで、科学的に新たな発見がなされないようでは意味がない。生命科学における次のブレークスルーは、細胞内のラフト(細胞膜で特定の脂質分子とタンパク質が集まった微小領域)やシナプスなどの100 nmに満たない小さな構造や反応場に存在する特定タンパク質の“数”の時間変化を計測することや、電子顕微鏡ではなしえない“生理機能”の超解像観察にあるはずだと、彼と筆者は意見が一致した。近い将来そのような技術にまで超解像法が昇華したとき、生命科学は次の時代に突入するであろう。

参考文献

- 1) E. Betzig, *Opt. Lett.*, **20**, 237 (1995).
- 2) W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.*, **62**, 2535 (1989).
- 3) T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida, *Nature*, **374**, 555 (1995).
- 4) R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *ibid.*, **388**, 355 (1997).
- 5) G. H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz, *Methods*, **32**, 445 (2004).
- 6) E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacio, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science*, **313**, 1642 (2006).
- 7) S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.*, **19**, 780 (1994).
- 8) T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8206 (2000).
- 9) S. W. Hell, *Science*, **316**, 1153 (2007).
- 10) R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki, *ibid.*, **306**, 1370 (2004).