

研 究 報 告 書

「1 分子超解像空間分析法の開発」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：池滝 慶記

1. 研究のねらい

取り扱いが簡単で生きた試料を観察できる光学顕微鏡は、生物学における不可欠な分析ツールであるが、回折限界が存在するため、空間分解能は 200nm 程度である。研究現場では、回折限界に制限されず高い空間分解能を提供できる光学計測法（超解像空間分析法或いは超解像法）の開発が大きな技術課題となっている。この課題を解決するために、2波長蛍光分光法と波面制御光学を技術融合させた超解像空間分析法を提案する。本分析法は2波長蛍光分光法で誘導される蛍光抑制効果を基礎とする(図1)。まず、第1のレーザー光（ポンプ光）で分子を S_1 状態へ励起し、次に第2のレーザー光（イレース光）を照射し S_n へさらに励起する。高励起状態 S_n に励起された分子は速い無輻射過程により蛍光を発しない。このため、2つの光が重なった領域では分子が S_n に励起され、 S_1 からの蛍光が消失する（蛍光抑制効果）。もし、イレース光をドーナツ状に整形して、2つの光を重ねて試料に集光照射すると、蛍光抑制効果により蛍光像は回折限界以下のサイズになる。イレース光として、マカロニ状のタイプ(図2-1)焦点のみで3次元的に光の当たらない

ダークホール(図2-2)をもつタイプがある。特に後者は、光軸方向に対しても蛍光像が収縮し、3次元的に回折限界以下のサイズになる。これを空間計測プローブとすることで横分解能に止まらず、深さ方向に対しても 100nm 上回る空間分解能を提供できる(超解像法)。この方法と蛍光相関法を組み合わせると、単に試料の空間構造を可視化するだけでなく、 10^{-21} 立方メートル(アトル)内に存在する溶液中の分子の相互作用を1分子レベルで解析できる。本研究では、上記機能をもつ 1 分子超解像空間分析法を確立し、バイオ分野における革新的な基盤技術を提供することを目標とする。

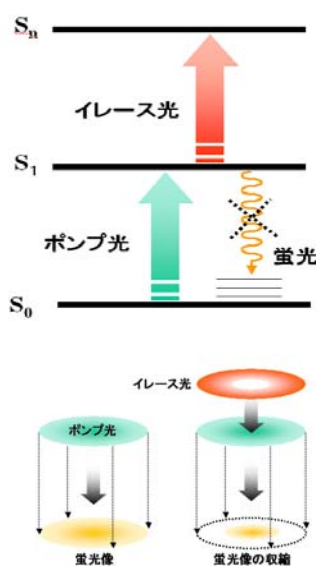


図1 超解像法の原理

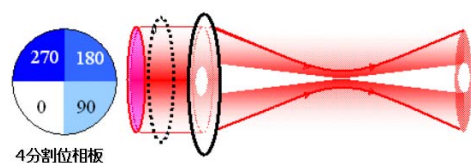


図2-1 マカロニ型

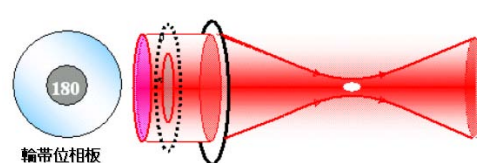


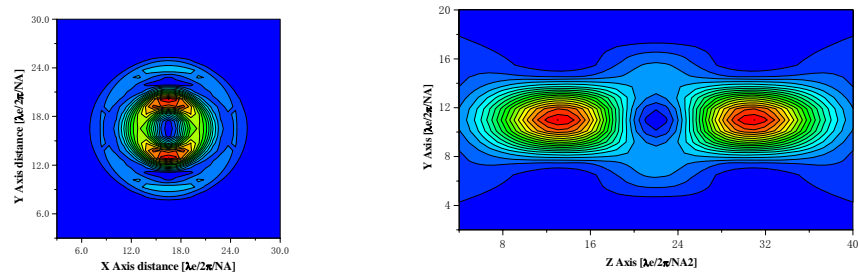
図2-2 ダークホール型

2. 研究成果

1) 1 分子超解像空間分析法の理論構築

フーリエ結像論を用いて3次元ダークホールの空間形状について理論的に評価を行った(図3)。この結果を元に、既存の2次元の超解像理論を3次元に拡張することに成功した。更に、これと蛍光相関計測理論と統合することにより、1 分子超解像空間分析法に関する指導理論を構築することができた。ローダミン 6Gをテスト分子に選定し、3次元的な蛍光スポットを計算した。その結果、100nm³(アトリットル)の立体分解能が期待できることが分かった。この蛍光スポットを用いて蛍光相関関数を計算したところ、通常の蛍光相関法に比べ、色素分子の濃度が2桁程度高い条件下でも蛍光相関関数が得られることが分かった。1 分子超解像空間

分析法の機能をほぼ予測できる指導理論が構築でき、その為の自作シミュレーションプログラムも整った。



(a) 焦点面内形状

(b) 光軸断面形状

図1: フーリエ解析結像論を用いて計算した焦点面近傍の3次元ダークホールの空間形状

2) 1分子超解像空間分析装置の作製

検証実験装置は市販レーザー走査型顕微鏡をベースに作製した。図4に示す様に、Nd:YAGレーザーの2倍波(532nm)をポンプ光とし、Krレーザーより発振した波長: 647 nm の光をイレース光とした。1本のシングルモードファイバーでデリバリーされたこれらの2色の照明光は、コリメートされた後、FV1000 ユニットの入射光に導入される。この際、イレース光を空間整形するために2種類の位相板を挿入した。一つは光軸を中心に4分割した位相板であり、透過したイレース光の位相が90° づつ階段状に変化する。このような光を集光すると光軸上で電場強度が相殺され、マカロニ状の強度分布をもつ。これは、微細な中空パターン形成できる特徴をもち、高い横分解能を提供できる。もう一つは、中央部分で位相が反転するタイプ様の輪帯位相板であり、これを通過したイレース光は干渉により焦点のみで光が当たらない3次元的中空構造、すなわちダークホールをもつ様に集光される。これは、深さ方向の分解能を提供できる特長をもつ。何れの場合も位相差は光学多層膜で与えられ、光学多層膜の波長分散性を用いイレース光のみが位相変調される様に設計されている。これらのビームをガルバノミラーにより、常に同軸で試料に対して空間走査する。本装置により、ポンプ光単独照射の蛍光像(通常計測)とポンプ光・イレース光同時照射の場合の蛍光像(超解像)を比較できる。

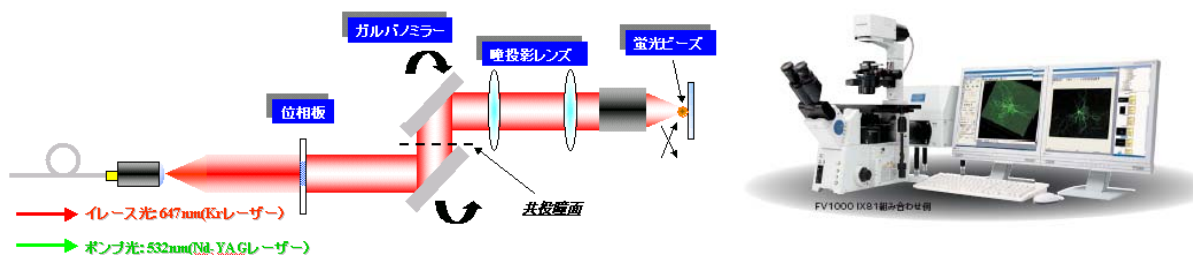
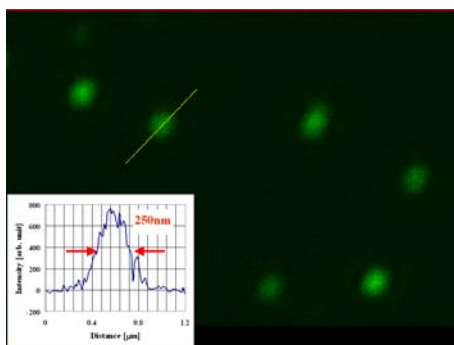


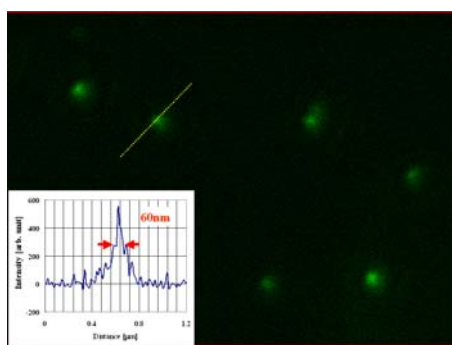
図4 実験装置の基本概念図

3) 超解像空間分析機能の評価

構築した分析装置を用い、提案原理に従い回折限界以下の空間分解能を有するかどうか検証した。まず、4分割位相板でビーム整形をしたイレース光を用いた場合における空間分解能の変化を調べた。具体的には、蛍光色素ナイルレッドを含有した粒径 60nm のポリスチレンビーズの蛍光像を計測する。図5-1はポンプ光単独照射時の蛍光像(通常計測)であるが、開口数 1.3 の対物レンズで 10mW のイレース光を同時照射すると(超解像計測)、蛍光像の径は、ほぼビーズ粒径の 60nm のサイズまで収縮している(図5-2)。すなわち、回折限界時の像の径が 250nm であることを考慮すると、回折限界の4倍以上空間分解能が向上している。



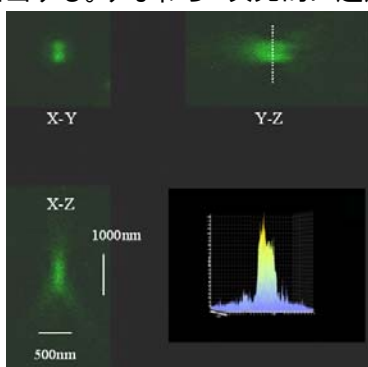
(1) 通常計測像



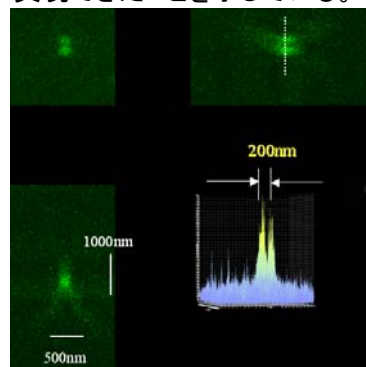
(2) 超解像計測像

図5 4分割位相板でビーム整形をしたイレース光を用いた場合における空間分解能の変化

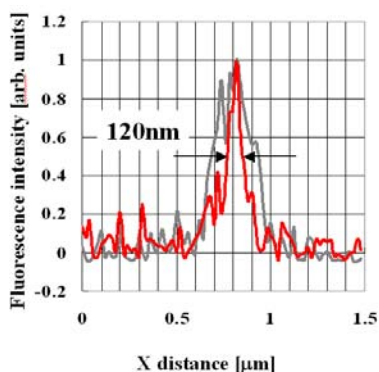
次に、輪帯位相板でビーム整形をしたイレース光を用いた場合における空間分解能の変化を調べた。この場合には、深さ方向にも蛍光像が収縮するため、ピエゾステージにより対物レンズと試料間の距離を相対的に変化させて3次元蛍光像を計測する。図6-1は、隣接した2個の隣接した蛍光ビーズのポンプ光単独照射時における蛍光像である。一方、図6-2は、2色の光を同時照射した場合における蛍光像である。焦点面内の蛍光像のサイズはポンプ光単独照射の場合と比較すると半分の 120nm 程度に縮小し(図6-3)、しかも、2点分解能が向上している。特に、光軸方向の蛍光像の収縮が著しく、サイズが回折限界の 1/3 以下の 170nm に収縮している(図6-4)。これは、体積に換算すると共焦点顕微鏡と比較して1桁小さい大よそ2アトに相当する。すなわち3次元的に超解像空間計測が実現できたことを示している。



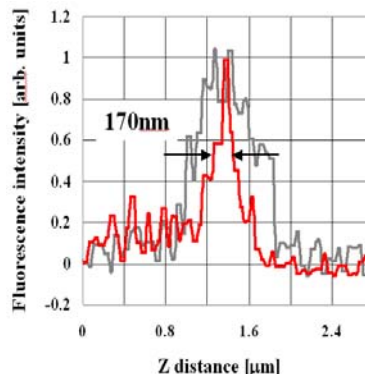
(1) 通常計測



(2) 超解像計測像



(3) X 軸上の強度分布

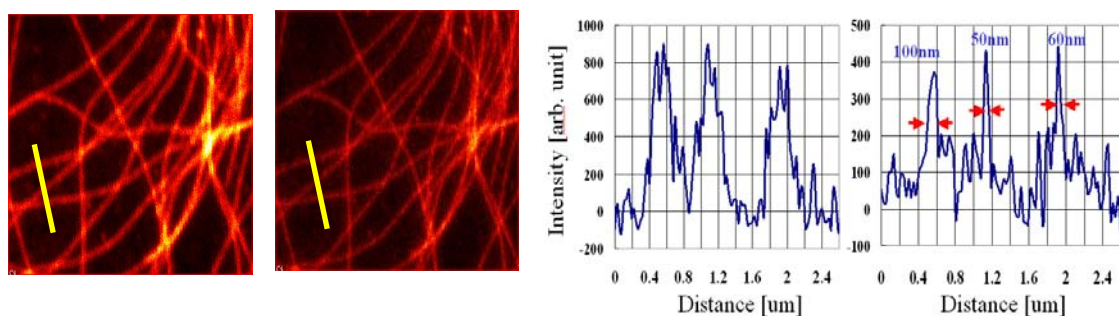


(4) Z 軸上の強度分布

図6 輪帯位相板でビーム整形をしたイレース光を用いた場合における空間分解能の変化：
(3)(4)において灰色線と赤線は、それぞれポンプ光単独照射時とイレース光同時照射時の強度分布を示す。

4) 生物用超解像レーザー走査型顕微鏡への応用

提案する空間分析法は、市販レーザー顕微鏡本体を改造することなく容易に機能搭載が可能であるので、空間分解能において差別化された汎用型の顕微鏡システムに応用できる。そこで、抗体染色したラットカンガルーの腎細胞の微小管(直径:30nm)を蛍光観察した。色素には、市販の Alexa546 を用いた。イレース光は、平面分解能が期待できる4分割位相板を用いてビーム整形した。図7によれば、超解像計測時には、重なり合った繊維構造が分解して観察でき、また、各微小管の蛍光像が細くなっていることが分かる(図7-2)。断面の蛍光強度を調べてみると、通常計測時には250nmであった太さが、超解像計測時には少なくとも100nm以下に収縮している。これは、図4の蛍光ビーズで得られた結果と一致している。更に、隣接した微小管が分解できていることが分かる。これは、蛍光ビーズを用いた空間分解能評価と矛盾しない結果を与えている。



(1) 通常計測像 (2) 超解像計測像 (3) 通常計測強度断面 (4) 超解像計強度断面

図7 超解像空間計測法を用いたラットカンガルー微小管の観察(4分割位相板)

5) 蛍光相関法への応用

本分析法では、顕微鏡といった可視化手段にとどまらず微小空間領域における粒子の挙動を解析することも可能である。ポンプ光とダークホールもつイレース光を同時に集光して、蛍光相関法により溶液中の蛍光体の強度揺らぎを解析すれば、ダークホール内の分子数や拡散定数等を多角的に解析できる。そこで、輪帯位相板でビーム整形をしたイレース光を用いて、前記蛍光ビーズ分散させた水溶液(10^{-8}mol/l)の蛍光相関関数を計測した。図8が示す様に、イレースの光強度を増加させると、相関関数の変曲点が短時間側にシフトしていくことが分かる。これは、超解像機能により蛍光スポットの体積が実行的に小さくなり、ビーム内に滞在する平均時間が短くなることを示しているので、提案する超解像空間計測が蛍光相関法に応用できることを意味している。すなわち、回折限界を上回る立体分解能で、蛍光相関計測が可能であることを示している。

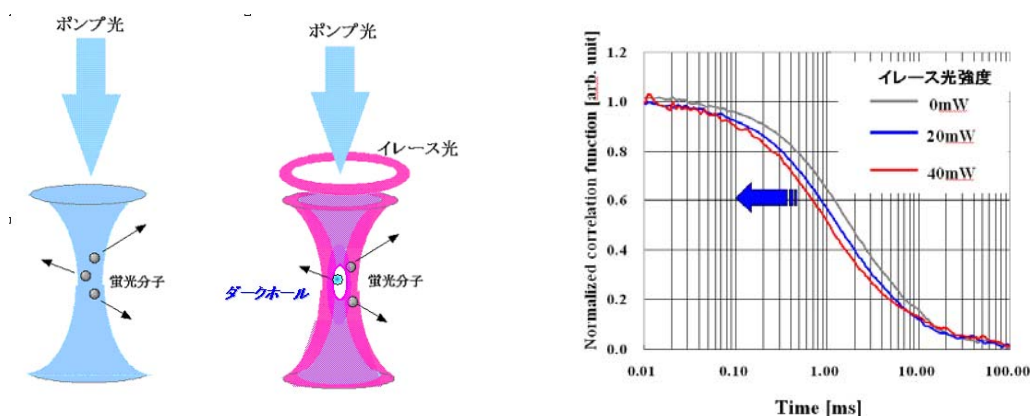


図8 超解像法を適用したときの蛍光相関関数の形状変化

3. 今後の展開

提案分析法においては、試料照明法の最適化およびレーザー走査型顕微鏡の光学系の精査により、空間分解能は更に向上する。現在、立体分解能は2アトムであるが、横分解能と縦分解能が同時に100nmを凌駕することが可能であり、次の目標として光学顕微鏡としては極限のzepto(10⁻²¹)の立体分解能を目指す。それと同時、レーザー走査型顕微鏡への技術搭載における実用面の個別課題を抽出し、これを解決することで、可視化や分析ツールとしてバイオサイエンスの現場で広く使える商品を創出して行きたい。本研究成果は、単にレーザー顕微鏡や蛍光相関分析装置といった既存商品への応用にとどまらない。フォトクロミック分子などの新たな記録材料などを用いることで、微小空間領域を選択的に光化学反応させたり力学的操作を加えたりすることができる。単に計測技術としてではなく、新しい高密度記録法、光造形法、更には生体組織のマイクロマニピュレーション手段としても利用できる。実用展開と同時に、このような新領域への展開をも目指す。

4. 自己評価

アトム(10⁻¹⁸)の立体分解能を有する超解像空間分析法を確立し、これが蛍光相関計測法に応用できることを実証した。これにより、超微小空間内でおきる拡散現象を解析できるツールとして期待できることを示すことができた。また、本技術は、生物用のレーザー顕微鏡における空間分解能の向上に寄与することも確認した。本研究で確立した計測法は、既存のレーザー走査型顕微鏡へ容易に技術搭載が可能であり、きわめて実用性が高いことが判明した。これは、計測機器産業における新たなイノベーション技術として期待できるものであり、予想外の成果であった。光学計測科学としての目標は、ほぼ達成したと考えられるが、当初目標に対して2つの未達成課題を残した。すなわち、現行では、蛍光相関機能を蛍光ビーズで検証している段階であり、まだ、1分子レベルでの機能確認に至っていない。また、生物試料への応用はまだ着手段階であり、バイオ分野へ幅広く応用展開を図る必要がある。今後、これらの課題を克服し、速やかに産業応用への道筋をつけることが新たな責務と考える。

5. 研究総括の見解

波動光学と分光光学を融合した超解像度光学顕微鏡、すなわち erase 光としてダークホール状あるいはマカロニ状にしたものを用い、pump 光で照射された回折限界スポット中において、さらに小さなスポットができるユニークな手法を用いた3次元的に回折限界を超えた顕微鏡の開発に成功したと言えるであろう。大いに評価したい。ダークホール型を蛍光相関法に適用し小さなスポットでの相関関数が得られるようにしたことも評価出来る。検証実験も今のところ蛍光染色した微小管のイメージングなど限られているものの超解像度をチェックしている。共同研究等で生物試料の測定例をさらに蓄積して本手法の有効性をさらに示し、生物研究者が使い易いものへと実装化されることを期待する。顕微鏡技術では日本の優位性を維持し続けていきたい。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Y. Iketaki, Three-Dimensional Super-Resolution Microscope Using Two -Color Annular Phase Plate, Appl. Phys. Express 3, 085203, 2010.
2. Y. Iketaki, Fabrication of a Calibration Scale for Biological Fluorescence Microscopy Using Nano Imprinting, Jpn. J. Appl. Phys. 49, 048003, 2010.
3. Y. Iketaki and T. Watanabe, Two-Photon Absorption in Rhodamine 6G Occurring in Concert with Fluorescence Depletion, Appl. Spectroscopy 64, 396, 2010.
4. Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, M. Fujii and T. Watanabe, Development of

Super-Resolution Microscopy: Application of Laguerre-Gaussian Beam to Microscopy, Topologica 2, 009,2009

5. N. Bokor and Y. Iketaki, Laguerre-Gaussian Radial Hilbert Transform for Edge-enhancement Fourier Transform X-ray Microscope, Opt. Express 17, 5533-5539, 2009.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 13 件(海外1件、国内12 件)(13 件とも非公開希望)

(3)学会発表

学会発表(国際)

・N. Bokor, A. Domonondon, and Y. Iketaki, Edge-Enhancement Fourier-Transform X-ray Microscopy, 18th International Symposium on the Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds, 2009.7. Sapporo.

学会発表(国内)

・池滝慶記、ナンドール・ボコル、渡邊武史、藤井正明. 直線偏光及び円偏光状態をもつ1次及・2次のラゲール・ガウシアンビームにおける中心強度に関する考察. 2008 年秋季第69 回応用物理学会学術講演会. 2008.9.名古屋.

・池滝慶記、渡邊武史. 2波長蛍光 Dip 分光法を用いた超解像顕微鏡法—3次元空間分析機能に関する理論的考察—.2008 年第2回分子科学討論会. 2008.9. 福岡.

・池滝慶記、渡邊武史. ローダミン 6G おける2光子吸収過程と蛍光抑制効果の競合. 第56回応用物理学関係連合講演会. 2009.3. 筑波.

・池滝慶記. ナノインプリント法による顕微鏡用スケールパターンの形成. 2009 年光化学討論会. 2009.9. 桐生..

・池滝慶記. 超解像蛍光計測法における空間分析能力に関する考察. 日本膜学会膜シンポジウム 2010. 2010.11. 京都.