

高速高分解能ライブ顕微鏡

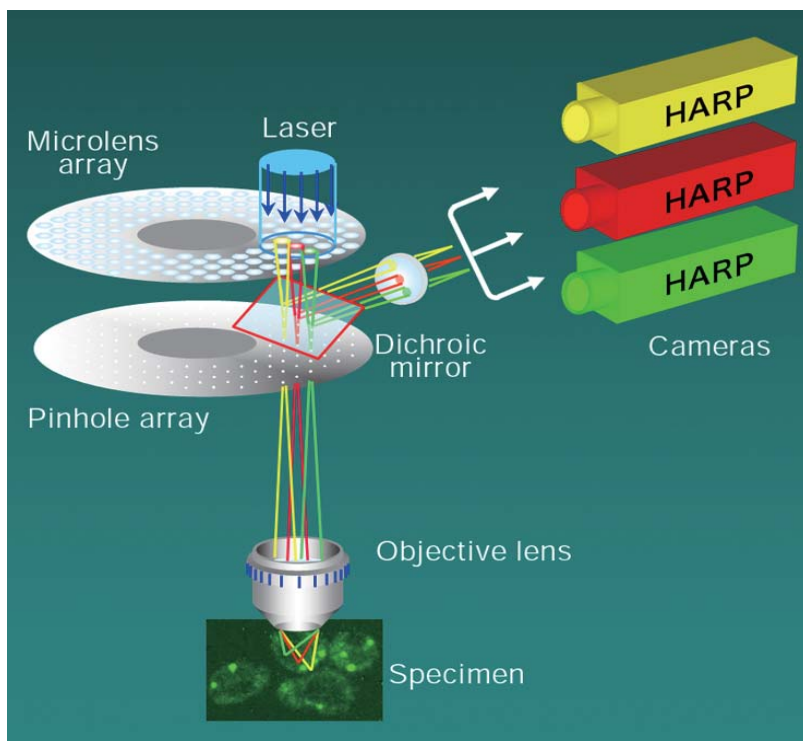
中野 明彦 (生物科学専攻 教授)

クラゲの光るタンパク質 GFP (green fluorescent protein) は、生物学を大きく変えた。GFP の偉大な点は、融合遺伝子の導入により、生細胞、生体内の狙った場所に蛍光プローブを発現できることにある。さまざまな色の類縁タンパク質が開発され、生細胞を自由自在に多色標識することができる時代になりつつある。いっぽうで、これらのプローブを生かすためには、顕微鏡の側の進歩もひじょうに重要であった。

私は 1997 年、生物科学専攻の助教授から理化学研究所に職を得、新しい研究室 (現在兼務) を主宰することになったところから、当時発表されたばかりの GFP を用いて、細胞内の小器官の間をさまざまなタンパク質がどのように運ばれるかを観察したいと考えていた。直径 50-60 nm という小さな膜小胞に乗った GFP を追いかけるのは、当時世の中にあった顕微鏡では至難の業であったが、理研で物理や工学の専門家と日常親し

く話すうちに、『ないんだったら作ればいいのか』と思うに至った。長い話になるので大幅に端折ってしまうが、横河電機との出会いがあり、NHK 技研との出会いがあり、また運良く NEDO の大型予算を頂いて、5 年がかりで開発したのが、世界に誇る超高感度高速共焦点レーザー顕微鏡装置 (裏表紙写真) である。

本機の基本的な特徴は、横河のスピンニングディスク方式高速共焦点スキャナと NHK の高感度 HARP (High-gain Avalanche Rushing amorphous Photoconductor) カメラの組み合わせにある。いずれもすでに実用機が市販されていたが、その設計から全面的に見直し、背景光ノイズの徹底的解消、高性能ダイクロミックミラーによる 3 色完全同時分光、イメージンテンシファイアと超高感度 HARP カメラの組み合わせにより CCD 比約 1 万倍の増感を果たした検出系等々、企業の技術者



高速高感度レーザー走査共焦点顕微鏡システム。スピンニングディスク共焦点スキャナ (ニポウディスク方式ともよぶ) は、円盤に約 20000 個のピンホールを開けたピンホールアレイと、そこにレーザー光を集光するマイクロレンズアレイからなるスピンニングディスクを高速 (1500-10000 rpm) で回転し、同時に約 1000 本の点光源を試料上でラスタースキャンする。蛍光は、同じピンホールを戻り、ダイクロミックミラーで分光された後、高感度 HARP カメラで観測される。1 個の点光源を、ミラーを機械的に動かすことによって走査する一般的な共焦点法に比べ、はるかに高速であることに加え、強い光源が 1 ヶ所に集中しないために、試料へのダメージや退色の問題が少ないこと、また光軸が全く動かないために、共焦点像を実像として観察できる、等々の多くの利点をもつ。

とわれわれ研究者と間での数えきれないほどの相互フィードバックによって完成したのが、この装置である。2004 年の完成時で、共焦点 2 次元 30 万画素で 180 frames/sec という高速撮像を達成した。これを用い、細胞小器官ゴルジ体の中をどのようにタンパク質が通過していくかに関する、世界を 2 分した大論争を解決したという話は、以前に本ニュースの「理学のキーワード」にも書いた (2009 年 9 月号参照)。思わぬ副産物であったのが、この高速性と高感度を生かした精密計測による、空間分解能の向上である。Abbe の回折理論により、可視光領域では分解能の限界は 200 nm 程度とされてきた。しかし、われわれの顕微鏡では、オーバーサンプリングとデコンボリューションにより、3 次元での空間分解能 60 nm という、驚くべき成果が得られている (表紙写真)。いま、世界中で回折限界への挑戦が続いているが、ライブ 3 次元観察において、われわれの顕微鏡に勝るものはまだない。さらに現在も、さらなる高速化、高感度化、多色化に向けて進化を続けている。