

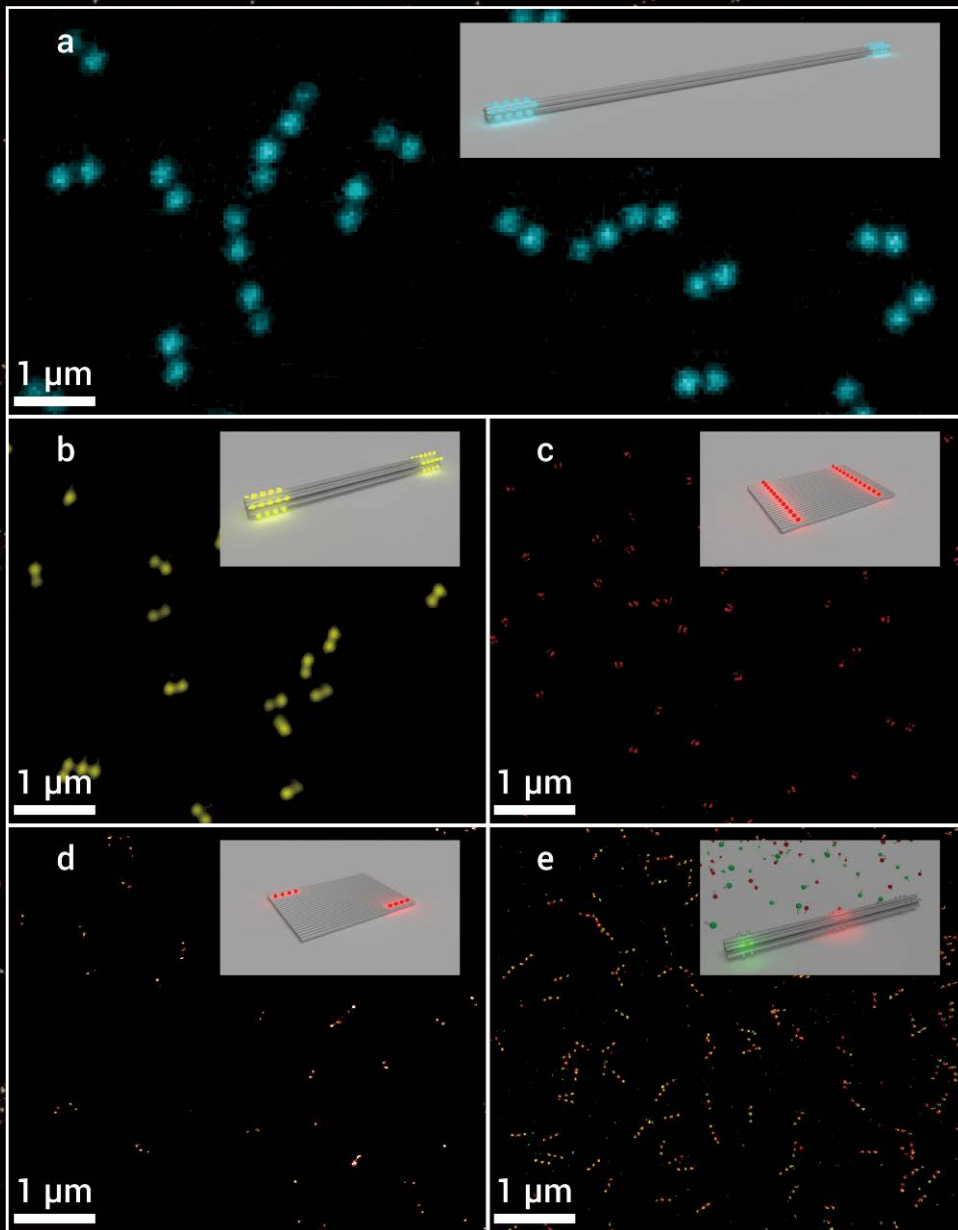
超解像イメージングのための革新的なツール

Innovative Tools for Fluorescence Microscopy

ナノルーラー：回折限界を超えた解像度の評価

近年、回折限界を打破した超解像顕微鏡技術がいくつも発明されたことで、蛍光顕微鏡法における空間的分解能は目覚ましい進歩を遂げました。しかしながら、信頼のおけるツールがなかったことで、これらの新規技術が正しいものなのかを検査するのは困難です。新たに開発されたナノ構造は色素分子をナノメートルレベルの正確さで配置することができ、またほぼ均一に製造することができます。

これらの構造は超解像顕微鏡だけでなく、これまでの蛍光顕微鏡の空間分解能の検査にも使用できます。



【図1】異なるイメージング技術のナノルーラー：(a)共焦点顕微鏡。2つの蛍光マーク間の距離は：350nm。色素：Alexa488(b)構造化照明顕微鏡法。距離：160nm。色素：Alexa568(c)STED顕微鏡法。距離：71nm。色素：ATTO647N(d)dSTORM用。距離：94nm。色素：Alexa647 (e)DNA-PAINT。1列に3個のデュアルカラースポット。隣り合うスポット間の距離：80nm。色素：ATTO655およびATTO550。

ナノルーラーが誕生した背景

21世紀最初の10年間は、光学顕微鏡の目覚ましい向上が見られた時期でした。光学的な回折限界は1873年にエルンスト・アッペにより定義されましたが、最高6ナノメートルの空間分解能を有する超解像技術が複数発明されたことでこの限界が打破されました。向上した空間分解能を達成するために超解像顕微鏡のユーザーが追う負担、つまりデータ評価だけでなく、セットアップ手順の複雑さや試料の準備といった作業の複雑さは日増しに高まっています。

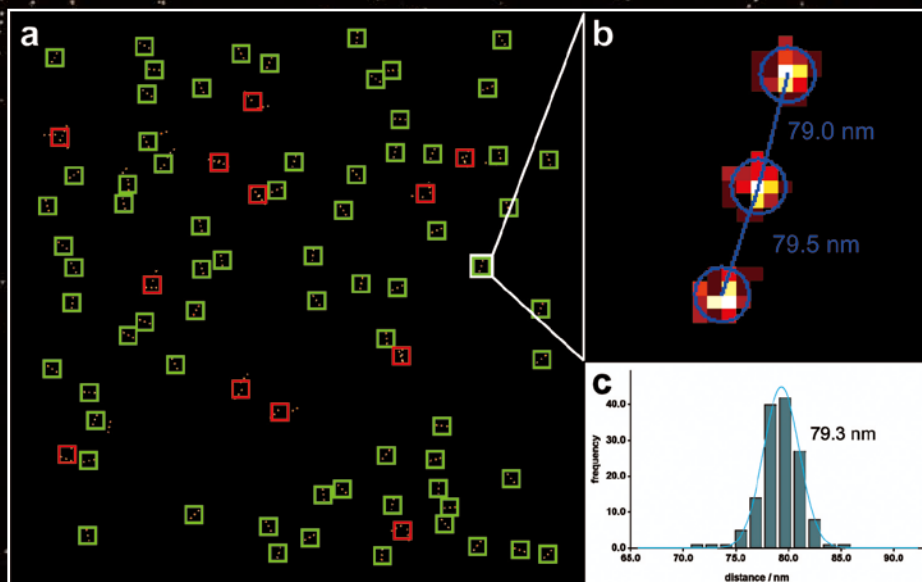
それゆえ、顕微鏡のハード的なスペックだけではこれら新技術の達成可能な空間分解能を計算することは、もはや不可能となっています。

空間分解能は、原則的にあらゆる顕微鏡の最も重要な仕様ですので、ユーザー、メーカー、開発者にとって達成可能な空間分解能を実験的に求めるのことは極めて重要となります。従来は、微小管やアクチンフィラメントといった細胞構造をイメージングすることで空間分解能の検証および測定が行われていました。しかしこれらの試料では、いくつかの不利な点が見られます。

蛍光マーク間の定まった距離で多数の同一の試料を提供していない、標識濃度や色素間の距離均一性が低いといった点です。これらの不利な点により、空間解像度を検査するための信頼できる目標試料としてこれらの試料を用いることは、ほぼ不可能です。

DNAナノテクノロジーに基づいたナノルーラー

上述の全ての要求を満たす検査試料は、いわゆるDNA折り紙技術により作成されます。端的に述べると、DNA折り紙構造はナノスケールのブレッドボードとして考えることができ、色素分子、蛍光タンパクあるいは一本鎖DNAに結合できる、本質的にあらゆる物質を配置することができます。DNA折り紙構造は高度に平行して製造することができ、自己集合を行います。そのため、 Cubix に利用可能な試料として使用することができます。DNA折り紙に基づいた、ナノルーラーの概略図は、図1でご覧いただけます。通常、いくつかの有機色素分子から成る蛍光マークが各DNA折り紙構造上に2個から3個ずつ配置されます。これら蛍光マーク間の距離は、6~360nmの範囲で自由に調整することができます。蛍光マークごとの色素分子の数は10~20の範囲にあり、一般に使用されている色素であれば基本的にナノルーラーに取り付けることができます。ナノルーラー検査試料はすぐに使える状態で製造することができ、DNA折り紙構造を μm^2 あたり約1個の濃度でカバースリップ上に固定します。つまり通常用いられる視野において数百個のナノルーラーが観測されます。これにより蛍光マーク間の距離を測定することができ、顕微鏡の空間分解能を検査し、測定の実験的エラーを計算できるようになります。同一構造が大量にあるため、超解像イメージ内のナノルーラーを自動的に検出する効率的なアルゴリズムを使用でき、蛍光マーク間の距離を測定できるようになります(図2)。すぐに使える状態のナノルーラーは冷蔵庫内で数か月間保存することができ、日常的に空間分解能を測定できるようになります[3]。図1にあるように、DNA折り紙構造に基づいたナノルーラーは従来の共焦点イメージングだけでなく、STED[4]、SIM[5]や、あるいはdSTORM、PALM、GSDIMまたはDNA-PAINT[6,7,8,9]などの位置情報に基づく技術といった、本質的に通常用いられるすべての超解像技術に最適化されています。研究室においてナノルーラーは、イメージングを最適化したり、超解像の原理を講義したり、顕微鏡が問題なく稼働しているかを判定したり、あるいはどの設定が研究室の要求に最も適しているかを決定したりするのに使用されます。顕微鏡のメーカーは、新規技術や新製品の開発だけでなく、自社製品が技術的な仕様や要求される空間分解能を満たしていることを実証するためにナノルーラーを用いています。



【図2】ナノルーラーを用いた測定の実験的データ解析：(a)ソフトウェア(GATTAAnalysis, GATTAquant GmbH)がイメージ化されたナノルーラーを正しく認識する。(b)ソフトウェアが蛍光マーク間の距離を測定。スポット間の距離の理論値は80nm。(c)測定された距離のヒストグラム。測定された値である(79.3±1.8)nmは理論値である80nmに良く対応している。

結論

超解像イメージングの新技术により、空間分解能が10倍ほど向上しています。しかし、試料の準備、顕微鏡の操作、データ解析には大変な労力がかかり、正確な空間分解能を計算することはもはや不可能となっています。DNA折り紙に基づいたナノルーラーは、蛍光マーク間の距離が一定であり、標準的なカバースリップ上で大量に固定できるという、理想的な検査試料です。ナノルーラーにより、従来の共焦点顕微鏡だけでなく、現代の超解像顕微鏡の空間的分解能を測定することができます。

References

- [1] Raab, M. et al. : Chemphyschem 15, 2431-2435 (2014)
- [2] Rothmund P.W.K. : Nature 440, 297-302 (2006)
- [3] Schmieid J.J. et al. : Nat Protoc 9, 1367-1391 (2014)
- [4] Klar T.A. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97,8206-8210 (2000)
- [5] Gustafsson M.G.L. : Journal of microscopy 198,82-87 (2000)
- [6] Heilemann M. et al. : Angewandte Chemie International Edition 47,6172-6176 (2008)
- [7] Jungmann R. et al. : Nano letters 10,4756-4761 (2010)
- [8] Betzig E. et al. : Science 313, 1642-1645(2006)
- [9] Fölling J. et al. : Nature methods 5,943-945(2008)
- [10] Schmieid J.J. et al. : Nat. Methods 9,1133-1134 (2012)