

## 3-4 生物の知を光と計算で読み解く — 分解能の限界を超える顕微鏡技術

### 3-4 *Deciphering the Wisdom of Life by Light and Computation — Microscopy beyond the Resolution Limit*

松田厚志

MATSUDA Atsushi

生物にはナノスケールの新しい記憶装置、モーター、センサーなどの技術革新への可能性がふれている。このように優れた技術を理解し、利用するためには、生物を生きのまま観察できる高分解能のイメージング技術が不可欠である。特に、複雑な生物の内部で目的の分子だけを観察できる蛍光顕微鏡は、最先端の生命科学に不可欠のツールである。近年、蛍光顕微鏡の最大の弱点であった分解能の制約は、超解像顕微鏡の開発により取り除かれ、ナノスケールの微細構造を直接観察できるようになった。その一方、分解能が向上したことによって、これまで軽視されてきた現実の生物試料と光学理論との乖離が、多くの問題を顕在化させてきている。本稿では、複雑な生物試料において高分解能を得るための取組を紹介する。

There is so much potential for mankind to innovate novel nanoscale memory devices, motors, and sensors if they learn from life. To understand and exploit the technology employed by life, biologists must rely on high-resolution imaging technology. Fluorescence microscopy, in particular, is an indispensable tool for state-of-art life science, for its higher contrast with a minimum perturbation. Recent development of super-resolution microscopy has eliminated the theoretical resolution limit of light microscopy, and enabled observation of nanoscale structures in living organisms. While the resolution has been enhanced, many issues have also emerged from the previously ignored deviation from the ideal optics. Here we review our efforts to obtain high resolution images by fluorescence microscopy in complex biological samples.

#### 1 まえがき

生物が実現している技術は人類の技術をはるかに凌駕している。例えば、遺伝物質である DNA は、化学的に暗号化された高性能の記憶装置である。DNA は、他の生体因子によって遺伝暗号がデコードされるだけでなく、自己組織化の原理に基づく自己複製、損傷に応答した修復再生、そして適応的に進化することができる。生物個体はシステムとして高度な適応性を持ち、エネルギーを高効率で利用するとともに、資源を循環して再利用する。このように優れた技術を理解し、使用することができれば、人類の技術は根本から変化するだろう。

生物がこのように優れた機能を発揮できるのは、様々な機能を持つ分子複合体が、僅か 10 ~ 150 nm (nm は、mm の 100 万分の 1) という極小の機能的な分子装置を形成しているからである。このような無数の

分子装置が、記憶装置、モーター、高感度センサーなどの機能を発揮している。生命体の内部では、このような極小の粒子や繊維が激しく変化しながら、全体として緻密な構造を形成していると考えられている。電子顕微鏡を用いれば、極めて高い分解能でこのような構造を見ることができるとは、動的な側面を知ることができない。生物の作り出す構造を正確に計測するためには、生物を生きのまま観察できる光を用いた高分解能のイメージング技術が必須である。

可視光を用いた蛍光顕微鏡によるイメージングは、医学・生命科学系研究で様々なブレイクスルーをもたらした。蛍光顕微鏡では、観察したいタンパク質などを蛍光物質であらかじめ標識し、励起光を照射すると、暗い背景の中に蛍光だけが浮かび上がる。背景とのコントラストが高く、微量の分子でも観察可能なので、医学・生物学分野で特に利用価値の高い顕微鏡である。さらに、2008 年のノーベル化学賞受賞となった緑色蛍

光タンパク質の開発によって、生きた細胞で目的の分子を見ることが簡単にできるようになった。遺伝子組換え技術により観察したい生物に蛍光タンパク質を導入すれば、生きたまま観察したい分子だけを光らせて観察できる。蛍光顕微鏡技術を利用し、更に発展させることが、生物の優れた能力のからくりを理解していくうえで必要である。

## 2 分解能の壁を越える顕微鏡技術

二つの近接した点を二つと見分けられる最小の距離のことを分解能という。顕微鏡の分解能には制限がある。顕微鏡では倍率も重要であるが、レンズを組み合わせれば無限に倍率を上げることができる。しかし、ある倍率以上になると2点を見分けることができなくなる。これが理論的な光の分解能の限界である。光を使用する光学顕微鏡の場合、分解能は光の波が重なり合う回折という現象のため、光の波長の約半分の大きさが限界となる。

この分解能の限界を打ち破ったのが、超解像顕微鏡の開発である。蛍光顕微鏡の分解能の限界は約250 nmだが、超解像顕微鏡法を用いれば15～100 nmという高分解能が得られる。この技術を開発した研究者は、2014年のノーベル化学賞を受賞した[1]-[3]。

### 2.1 超解像顕微鏡

超解像顕微鏡は、光の物理法則を変えたのではない。光の物理法則の制約の中で、分解能を制約する原因を回避する戦略を用いたのである。例えば、構造化照明法は、サンプル中の顕微鏡の分解能よりも微細な模様、励起光で作った別の模様を重ね合わせることで干渉による模様を作り出す[4] (図1)。この干渉模様はモアレと呼ばれ、元の模様よりも大きな模様になる。そのため、通常の顕微鏡の分解能でも、モアレを観察できる。この観察したモアレと、重ね合わせた既知の模様から、サンプル中の微細な模様を計算によって求め

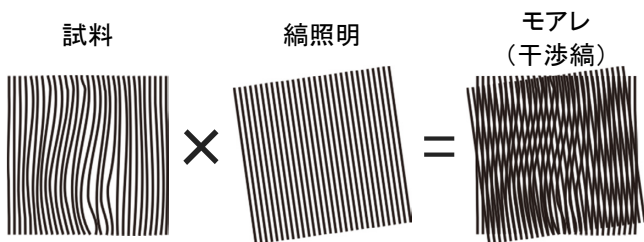


図1 構造化照明法の原理

試料の模様が微細であれば、通常の顕微鏡では観察できない。しかし、既知の模様(縞)を持つ照明を重ね合わせると、模様同士が干渉し合いモアレ(干渉縞)が発生する。モアレは元の模様より大きいので、通常の顕微鏡で観察できる。観察したモアレと既知の縞照明の情報を基に、試料の姿を計算により解くことができる。

ることができる。このように、直接見ている画像は通常の分解能の制約に縛られているが、コンピュータ上での計算によって初めて分解能の壁を越える画像が得られるのである。

### 2.2 分解能低下を防ぐ技術

超解像顕微鏡法は原理実証されたが、生きた生物を用いて実際に計測を行うのは極めて困難である。超解像顕微鏡は、極限の分解能を追求するために、理想的な条件からの僅かな逸脱によっても理論が破綻し、分解能が大幅に低下したり、アーティファクト(画像処理過程で発生するデータの誤りや信号のゆがみにより本来存在しないような構造が生じること)が生じたりしてしまう。我々は超解像顕微鏡法を実際の生物に適用するうえで必要となる技術の開発に取り組んできた。例えば、立体的な細胞では非焦点面の蛍光ノイズが強くなり、そのために分解能が大きく低下する。このような非焦点面の蛍光を除くデコンボリューションや蛍光ノイズを低減させるデノイジングなどの画像処理を超解像顕微鏡法に適用し、蛍光ノイズの存在下でも高分解能を得ることに成功した[5]-[7]。また、従来は、超解像顕微鏡法により得られた画像に生じるアーティファクトの原因の特定は困難であった。この問題に対し、我々は、得られた画像を空間周波数領域で解析することにより、光軸のズレや迷光のような光学調整の問題を簡単に特定できる解決法を提案してきた[8][9]。

しかし、現在の蛍光顕微鏡法における避けがたい問題が、生体試料自体の持つ屈折率の問題である。細胞自体がビー玉のような屈折率物体として働くため、観察対象によっては細胞という“レンズ”を通して観察することになり、観察が困難・不可能になる(図2 A)。例えば、動物の初期胚を従来の顕微鏡で観察すると、対物レンズに近い部分はよく見えるが、その反対側の深部の領域の像劣化は激しく、ほとんど見るができない。生物試料の屈折率は極めて複雑に変化しているため、現在の顕微鏡では、組織深部の幹細胞や神経シナプスなどを高分解能で観察することは極めて困難である。

生体試料が持つ屈折率の問題を解決するためには、屈折率をリアルタイムで測定し補正できる補償光学(Adaptive Optics: AO)の開発が不可欠である。AOは、天体望遠鏡に使用されてきた技術であり、地表の大気のゆらぎを光学的に取り除き、地表の天体望遠鏡からでも宇宙の姿を高分解能で観察できる技術である。AOは日本ではNICTで研究されてきた技術であり[10]、衛星との宇宙光通信にも使用されている[11][12]。AOでは、まず波面センサーにより光の波面のゆがみを計測する(図2 B)。次に、形を自在に変

形できる可変形鏡を用いて、ゆがんだ波面を打ち消すことにより、光の波面を修整する(図2B)。このように波面を補正した光をカメラに結像させると、大気屈折率ゆがみが補正され、地表からでも宇宙空間と同等の高分解能で天体を観察できる。我々はこの手法を生物学の顕微鏡に応用し、生体深部における分解能の復元を行っている。

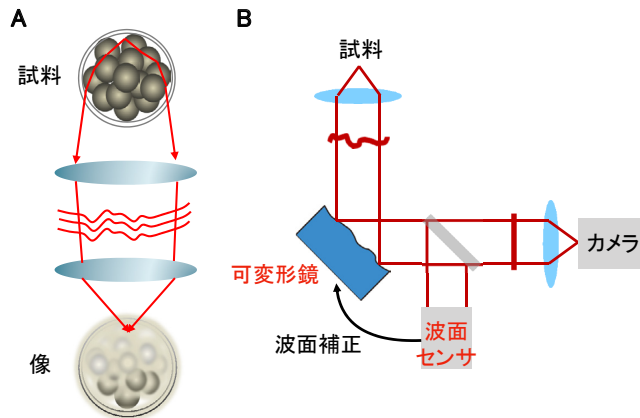


図2 生体試料の屈折率の問題点と解決法

(A) 生体試料自身の持つ複雑な屈折率のために光が折れ曲がり、深部(裏側)はほとんど見えない。(B) 補償光学顕微鏡の模式図。試料からの光の波面を波面センサーで計測し、可変形鏡により波面を補正すれば、高分解能の画像を取得できる。

### 2.3 色収差補正技術

蛍光顕微鏡では、異なる標的分子を異なる蛍光色(青、緑、赤など)で染め分けることによって、複数の標的分子を同時に観察できる。しかし、光の屈折率は光の波長により異なるため、顕微鏡画像には僅かな色ズレが生じる。超解像顕微鏡により向上した分解能では、僅かな色ズレでも結果の解釈が困難になってしまう。特に生体の屈折率変化は予測できないため、生体観察における色ズレを正確に補正することは、従来は非常に困難であった。この問題を解決するため、我々は、高精度の色収差補正にも取り組んできた。生体における色ズレ量を計測する画像取得法と計算方法を世界で初めて開発し、3次元の試料で約15 nmという極めて高い補正精度を実現した[13][14]。この精度であれば多色の超解像顕微鏡画像の結果を正しく判定できる。この画像取得法と画像処理ソフトウェアを世界中の超解像顕微鏡ユーザーに公開して、科学研究におけるデータの正しい解釈に貢献している[15](図3)。

この高精度の色収差補正技術は、二点間距離の計測における飛躍的な精度向上にも応用できる。二点分解能より近接した場合、同じ色であれば二点は混じってしまい一点にしか見えないが、二点がそれぞれ異なる色であればカラー画像から二点を見分けることがで

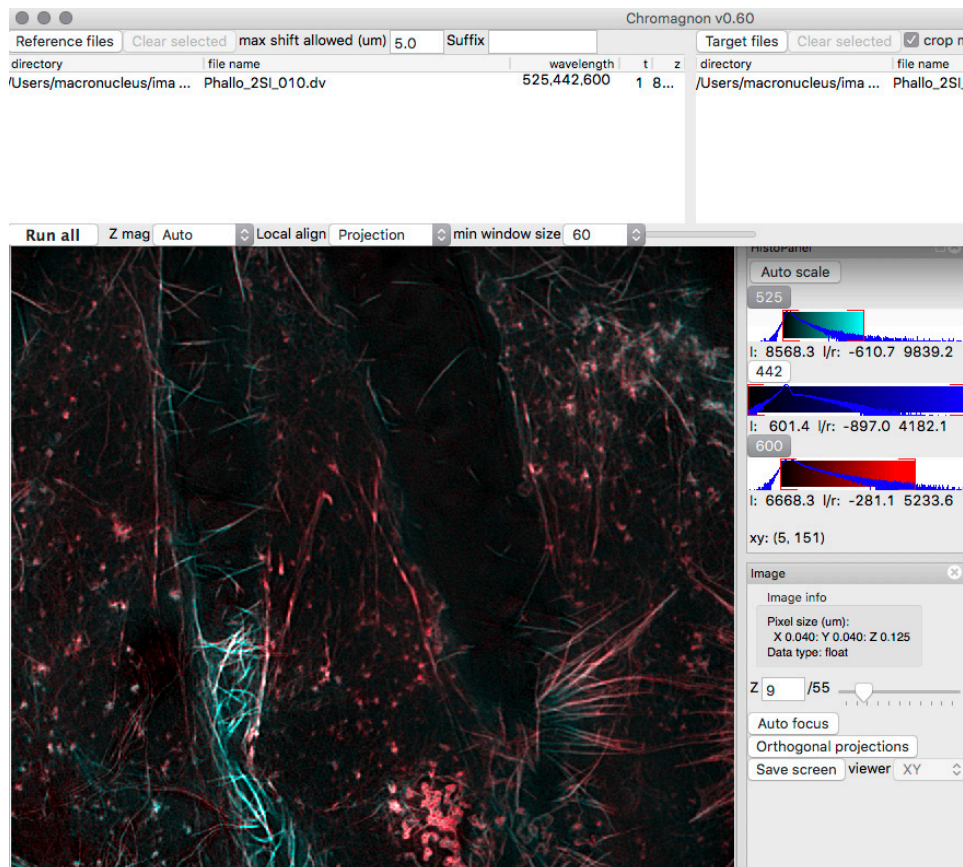


図3 公開しているソフトウェアのスクリーンショット

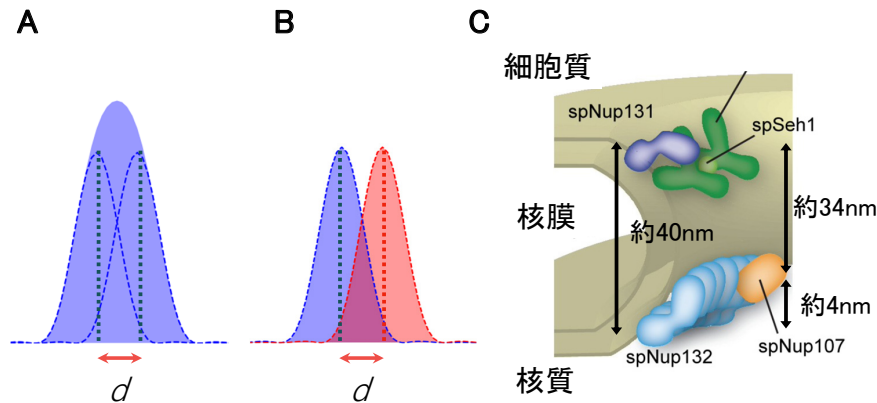


図4 色収差補正技術を利用した高精度距離計測  
 (A) 同じ色の二点が近接すると分離できない。(B) 二点間距離 (d) が同じでも、異なる色の二点は分離できる。(C) 生きた細胞の核膜孔複合体の内部にあるタンパク質因子間の距離 (参考文献 [16] から改変)。

きる (図 4 A, B)。異なる色の二点を撮影したカラー画像からコンピューター上で計算すると、通常の分解能をはるかに超えた精度で二点間距離を計測できる。この方法によって、僅か 150 nm の核膜孔複合体という極小の分子マシンの構成するタンパク質因子の間の距離を数 nm の精度で計測することができた (図 4 C)[16]。この距離計測を、生きた細胞の内部で行うことができた。

### 3 展望・未来の ICT

ヒトとモノをつなぐ未来の通信技術の発展には、生命に対する深い理解が欠かせない。また、多様な問題に直面している人類にとって、生物の持つ優れた技術を理解し、利用することは急務とも言える。生物にはナノスケールの新しい記憶装置、モーター、センサーなどの新技術の可能性にあふれている。ナノスケールの生命理解に向けて、光を用いたイメージング技術は、今後もバイオ研究を支える基盤技術となるだろう。超解像顕微鏡により顕微鏡の分解能の限界は破られたが、生体深部で高分解能を発揮するためには、更に研究開発が必要である。光を操るとともに、計算により画像から情報を引き出すような研究は、今後更に重要性を増すだろう。光学など情報通信分野の技術が集まる NICT においては、情報通信技術を応用した新しい顕微鏡技術を開発することが可能である。更なる生命の理解に貢献できるように、我々は今後も顕微鏡の分解能と観察深度の向上を推し進め、見える世界を広げる研究を行う。

#### 【参考文献】

- 1 S. W. Hell, "Nanoscopy with Focused Light (Nobel Lecture)," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol.54, no.28, pp.8054–8066, July 2015, doi: 10.1002/anie.201504181.
- 2 E. Betzig, "Single Molecules, Cells, and Super-Resolution Optics (Nobel

- Lecture)," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol.54, no.28, pp.8034–8053, July 2015, doi: 10.1002/anie.201501003.
- 3 W. E. Moerner, "Single-Molecule Spectroscopy, Imaging, and Photocontrol: Foundations for Super-Resolution Microscopy (Nobel Lecture)," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol.54, no.28, pp.8067–8093, July 2015, doi: 10.1002/anie.201501949.
- 4 M. G. L. Gustafsson, "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy," *Journal of Microscopy*, vol.198, no.2, pp.82–87, 2000, doi: 10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x.
- 5 A. Matsuda et al., "Condensed Mitotic Chromosome Structure at Nanometer Resolution Using PALM and EGFP- Histones," *PLoS ONE*, vol.5, no.9, p.e12768, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0012768.
- 6 P. M. Carlton et al., "Fast live simultaneous multiwavelength four-dimensional optical microscopy," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol.107, no.37, pp.16016–16022, Sept. 2010, doi: 10.1073/pnas.1004037107.
- 7 M. Hamasaki et al., "Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites," *Nature*, vol.495, no.7441, Art. no.7441, March 2013, doi: 10.1038/nature11910.
- 8 J. Demmerle et al., "Strategic and practical guidelines for successful structured illumination microscopy," *Nat. Protoc.*, vol.12, pp.988–1010, 2017.
- 9 A. Matsuda et al., "Highly condensed chromatin is formed adjacent to subtelomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast," *Nat. Commun.*, vol.6, art. no.7753, July 2015, doi: 10.1038/ncomms8753.
- 10 H. Takami and M. Iye, "Membrane deformable mirror for SUBARU adaptive optics," in *Adaptive Optics in Astronomy*, vol.2201, pp.762–767, May 1994, doi:10.1117/12.176110.
- 11 豊嶋守生, "超小型衛星が見せる新たな可能性," *NICT NEWS*, pp.1–3, Oct. 2017.
- 12 久保岡俊宏, "HICALI の開発 - 静止衛星 - 地上間の超高速光衛星通信を目指して," *NICT NEWS*, pp.10–11, Oct. 2017.
- 13 A. Matsuda, L. Schermelleh, Y. Hirano, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka, "Accurate and fiducial-marker-free correction for three-dimensional chromatic shift in biological fluorescence microscopy," *Scientific Reports*, vol.8, no.1, p.7583, May 2018, doi: 10.1038/s41598-018-25922-7.
- 14 F. Kraus et al., "Quantitative 3D structured illumination microscopy of nuclear structures," *Nat. Protoc.*, vol.2, pp.1011–1028, 2017.
- 15 A. Matsuda, T. Koujin, L. Schermelleh, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka, "High-Accuracy Correction of 3D Chromatic Shifts in the Age of Super-Resolution Biological Imaging Using Chromagnon," *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, no.160, p.e60800, June 2020, doi: 10.3791/60800.
- 16 H. Asakawa et al., "Asymmetrical localization of Nup107-160 subcomplex components within the nuclear pore complex in fission yeast," *PLOS Genetics*, vol.15, no.6, p.e1008061, June 2019, doi: 10.1371/journal.pgen.1008061.

**松田厚志** (まつだ あつし)

未来 ICT 研究所  
フロンティア創造総合研究室  
主任研究員  
博士 (理学)  
生物物理学、分子細胞生物学