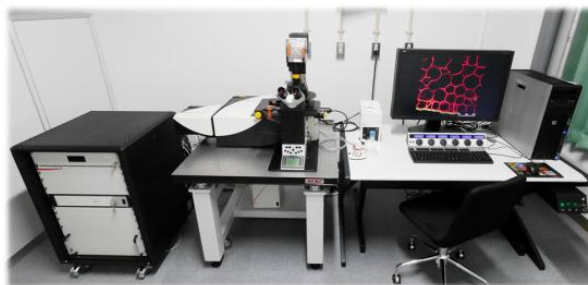


超解像・共焦点レーザー顕微鏡の紹介

農学部研究教育支援センター 技術職員 奥川友紀

1. 研究教育支援センターについて

共同利用の施設として H22 年度に農学研究院に設置され、現在 7 名の技術職員がその業務に従事し、センターの装置 10 台を運用管理している。私は、超解像・共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP8 STED: H25.12 設置、H26.5 より共通利用開始) を担当し、その管理と運用、撮影時の利用者のサポートを行っている。



2. 超解像・共焦点レーザー顕微鏡 Leica TCS SP8 STED について

光学顕微鏡の分解能^{※1}は理論上 200 nm が限界だが、2014 年ノーベル化学賞受賞の Stefan Hell 氏の考案により、分解能 50 nm で撮影可能な STED 顕微鏡 (Stimulated Emission Depletion Microscope) が開発された (Leica TCS SP8 STED)。

STED 顕微鏡は、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (Confocal Laser Scan Microscope: CLSM)^{※2} をベースにした顕微鏡で、CLSM の特徴である蛍光染色法^{※3} による組織・細胞内部の断層撮影、経時変化観察等が行える顕微鏡である。高分解能顕微鏡で有名なものに電子顕微鏡があるが、電子顕微鏡は観察時に超真空状態にしなければならず、また、電子線を試料に照射させる必要もあるため、細胞の生きたままの姿を捉えることは不可能である。一方で CLSM 顕微鏡は、ライブセルイメージングが可能であり、生細胞内のターゲット分子や物質の時空間分布、移動、相互作用等の解析等に有用である。

当センターの STED 顕微鏡は、新しいレーザー光源である ‘ホワイトライトレーザー(WLL)’ を搭載しており、1 nm 単位で励起波長を設定できる(470-670 nm の範囲)ため、最大効率での励起が可能である。これによりセルダメージを低減させた撮影が行える。さらに、WLL のパルス発振機能と高感度ハイブリッドディテクター(HyD)、及び STED レーザーを併用すると、上述の 50 nm 分解能での撮影が可能となる。ポスターでは、STED の原理やその外の機能(多重染色時に有用なシーケンシャルスキャン等)についても簡単に紹介する。

参考：センター装置紹介ページ <http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/shien/tcssp8sted.html>

3. 立会い測定から学ぶこと

ユーザーが装置の扱いに慣れるまで、立会い測定をさせて頂いている。観察の初期段階で最適な撮影条件の設定と検討を行う必要があるが、サンプルは多様であり(蛍光試薬、サンプルの特徴、使用したいアプリケーションは様々)、経験を要する。サイズの大きな細胞(厚み 100 μm)の Z スタック撮影における課題点及び解決法を、一例として紹介する。

※1 離れた 2 つの点を 2 つとして見分けられる最小の間隔

※2 試料面をスポット状のレーザービームで走査して焦点面からのシグナルを記録し、コンピューター上で切片画像を構築する。X-Y 平面画像が得られる他、平面画像を複数撮影することにより Z 軸方向の情報も取得でき、自動で XYZ の 3 次元画像が得られる。

※3 蛍光色素によるタンパク質や核酸等の標識や染色、GFP 等の蛍光タンパク質の発現等により、目的の組織、細胞、タンパク質等を蛍光により特異的に観察・解析する方法