

顕微鏡は微生物学の基本 II —顕微鏡によるバイオイメージング—

尾碕 一穂

顕微鏡で拡大しなければよく見えない微細な生物を微生物と呼ぶのだそうで、まさに『顕微鏡は微生物学の基本』である。微生物には、細菌、酵母、原生動物、菌類の一部などが含まれる。生物とは呼べないような環状一本鎖RNAのウイロイドや大きさがおよそ300 nm以下のウイルスなどもこの分野の研究対象であるらしい。顕微鏡といってもいろいろあるが、今回お話しするのは可視領域の光を利用する光学顕微鏡で、ウイルスやウイロイドは小さすぎて見えない(蛍光法で光る点として存在を示すことは可能で観察対象でないというわけではない)。

生物で利用する光学顕微鏡には明視野顕微鏡、暗視野顕微鏡、位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡、偏光顕微鏡、蛍光顕微鏡がある。ほかに蛍光顕微鏡から派生した共焦点レーザー走査型顕微鏡、ニポードディスク式共焦点顕微鏡、多光子励起レーザー走査型顕微鏡、全反射顕微鏡、蛍光寿命イメージング顕微鏡などが研究用顕微鏡として利用されている。

近年、研究用途では蛍光法が多用されるが、蛍光顕微鏡にはほかの観察法にはない多くの応用手法(アプリケーション)があるためである。見たいところだけ光らせてコントラストよく観察できるという利点に加えて、たとえば普通は目に見えない、細胞内で起こっているイオン濃度(カルシウムイオン濃度やpH)の変化を、蛍光色素をセンサーとして利用することで、顕微鏡下に可視化し画像として捉え計測することができる。今回は微生物を材料とする研究領域においても利用が期待される蛍光顕微鏡の手法を中心に紹介する。

顕微鏡で見るもの、見えるもの

小動物から分子まで 光学顕微鏡の観察の対象となるのは、およそ0.2 μm ~1 mmの範囲で、細胞を構成する要素(ミトコンドリアや染色体)や細菌から細胞の塊(組織片)、小さな個体レベルの大きさになる。細胞の大きさは人の場合生体中では6~25 μm で、株化された細胞はもう少し大きいサイズになる場合が多い。図1にあるように、ウイルス(ファージは細菌に感染するウイルス)は大きさが光学分解能以下で、通常では顕微鏡の対象から外れる。ゾウリムシは見えるといっても肉眼では小さな点として見えるだけである。

標本は色素で染色する 研究や検査で顕微鏡を利用するためには、見たいところを観察しやすいように加工した標本を準備する。光が透過できるように薄い切片にする、見たいところに色をつける、などである。染色に先立って固定(アルコール固定やホルマリン固定など)されていることが多い。何も手を加えずそのまま観察したいという場合もある。その場合は、染色をせず位相差法や微分干渉法による光学的コントラストをつけることで生きたまま観察する。

色素を利用する染色は病理組織標本作製で行われている。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色(組織切片試料)やパパニコロウ染色(喀痰や婦人科試料)、グラム染色(一般細菌試料)など目的に応じた染色が行われる。

蛍光色素による染色では蛍光抗体法の利用が多い。他には、①核染色(核内のDNA)、②膜染色(細胞膜やオ

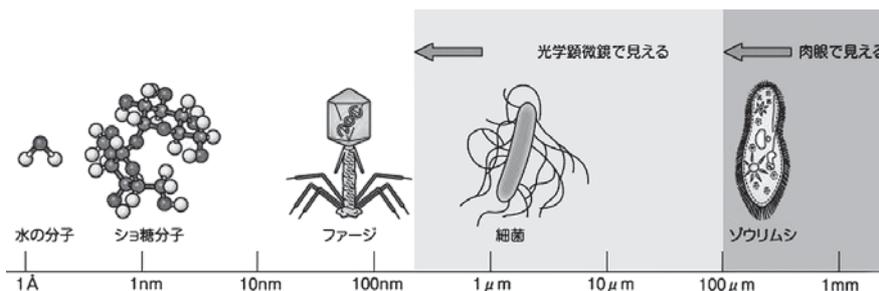


図1. 肉眼で見える大きさ、顕微鏡で見える大きさ

ルガネラ膜), ③特異結合染色 (キノコ毒ファロイジンとアクチン繊維やアビジンとビオチン, α ブングロトキシシンとアセチルコリン受容体) などがあり, 細胞内構造の染め分けなどが行われる。

蛍光法による観察では, 散乱光を利用する暗視野法観察とともに, 分解能以下の大きさのものでも, 大きさは当てにならないが存在を確認できる。

蛍光で生きたまま観察

蛍光法によるライブセルイメージング 蛍光染色は, 固定した試料の観察でも重要な手段だが, 最近『生きたまま』の観察がトレンドになっている。微細領域で起こる変化を生きたまま捉えたいという要望は以前からあったが, 蛍光染色を利用するライブセルイメージングはあまり盛んではなかった。それには理由があり, ①生細胞内の染色(タンパク質など)ではマイクロマニピレーションが必要となる, ②長時間計測を続けると蛍光色素に退色が起こる, ③画像データはフィルムに記録することになる, ためである。

そんな中, 細胞内のカルシウムイオン濃度計測が, 蛍光色素プローブを利用して, 簡単にだれでもできるようになった。化学修飾した蛍光色素プローブは培養液中に入れるだけでよく, 細胞膜を透過すると細胞内の酵素により不透過性になり細胞内にトラップされる。蛍光色素プローブは新規の生命科学研究用蛍光色素を積極的に開発するモレキュラープローブス社(現在国内ではライフテクノロジーズジャパンのインビトロジェン社の一部)から提供された¹⁾。ハード面では, 高感度テレビカメラが入手しやすくなって長時間の計測でも退色を防ぐことができるようになり, パーソナルコンピュータ(PC)の発展が著しく, 高速にリアルタイムの計測を可能にした。カルシウムイメージングに大ブームが押し寄せ, 『蛍光色素で形態だけでなく機能が見える』というフレーズがよく使われ, 同時にライブセルイメージング発展の幕開けとなった。

カルシウムイメージング(イオン濃度計測)ではレシオ法(ratio imaging)が用いられる。イオン濃度変化に応じて蛍光強度が逆方向に変化するようなふたつの波長で蛍光強度変化画像を取得し, その比画像を得る。比を取ることで, 濃度変化以外の要因による蛍光強度変化(たとえば細胞が縮んで色素濃度が濃くなったり, 色素が退色して濃度がうすくなったりする)の影響を除去できる。単波長の強度変化に比べてレシオ値は何倍も大きく変化する。レシオ値はイオン濃度に対応しており, キャリブレーションをとれば実濃度に換算できる。

レシオイメージングは分子間相互作用(FRET計測)でも行われる。FRET(fluorescence resonance energy transfer)は蛍光共鳴エネルギー移動と訳され, 蛍光色素間で起こるエネルギー移動のことで, エネルギーを供与する蛍光色素の蛍光波長域と受け取る蛍光色素の励起波長域が重なるような色素組み合わせで, 色素が近接したとき起こる。タンパク質の結合と解離を調べるために利用したり分子間の相互作用を利用したプローブ(たとえばカルシウムイオン濃度プローブ『カメレオン』)作製に応用したりすることができる。比画像を得ることでFRETの検出, 確認が容易になる。

図2に示す実験例はFRETを利用したカルシウムイオン濃度プローブ『カメレオン』(理化学研究所宮脇敦史先生ご提供)で, 2波長計測によりカルシウムイオン濃度が振動する様子を示している。カメレオンを発現するHeLa細胞をヒスタミン刺激したところ, 投与直後にカルシウムイオン濃度が上昇し, その後増減を繰り返している様子を示している(レシオ像は示していないが, 二つの波長の蛍光強度が刺激後逆向きに変化していることから, カルシウムイオン濃度の変化を捉えていることがわかる)。

カメレオンはふたつの蛍光タンパク質(CFP-YFP)の間で起こるFRETを利用するカルシウムイオン濃度プ

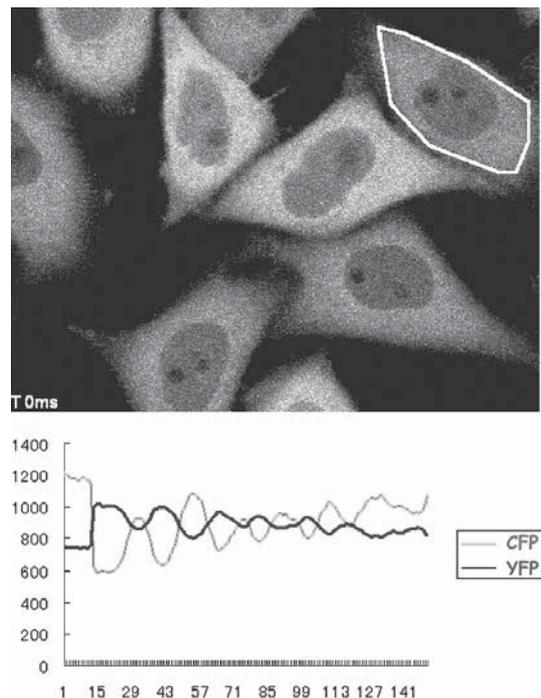


図2. カメレオンでカルシウムイオン濃度計測。カメレオンを発現するHeLa細胞をヒスタミン刺激。440 nmで励起し, 白い枠の細胞について, 485 nmと530 nmの蛍光強度変化をプロットした(1.5秒間隔で4分間)。

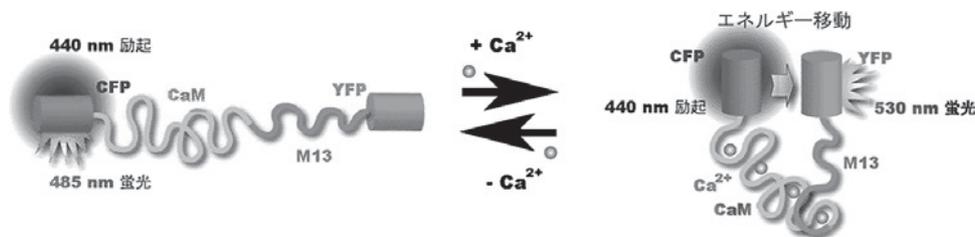


図3. カルシウムイオン濃度センサー『カメレオン』。CFPとYFPの間に、CaM（カルモジュリン）とM13（カルモジュリン結合ペプチド）が連結されている。

ロープで図3のようにふたつの蛍光色素の間にカルシウムイオンが結合するサイトが設けられている。カルシウムイオンが結合すると分子が折れ曲がり、CFPとYFPが近接しエネルギー移動が起こる。直列型と折れ曲がり型の二つの状態はカルシウムイオンの結合・解離により生じ、反応速度が十分速いのでセンサーとして利用できる。CFPを励起したとき直列構造ではCFPの蛍光が出てくるが、折れ曲がるとエネルギー移動が起こり、YFPが励起され蛍光が発せられる。二つの蛍光波長領域で同時に画像を取得することでカルシウムイオン濃度変化を検出する。カルシウムイオン濃度が上昇するとCFPの蛍光画像が暗くなりYFPの蛍光画像が明るくなる。

ライブセルイメージングの流行はなんとといっても蛍光タンパク質の発展によるところが大きい。イオン濃度計測や核染色、膜系染色では生染色が行われていたが、蛍光染色利用で多数を占める蛍光抗体法は、一般に固定して行うので、生体内のタンパク質の動向を生きのまま見ることができない。初期には十分でなかった、蛍光タンパク質の退色の起こりやすさや色のバリエーションの少なさがあつという間に改善され、蛍光染色の中心的存在となってきている。

蛍光観察で主流の共焦点レーザー走査型顕微鏡 レーザ顕微鏡が注目されるきっかけは蛍光観察において光軸方向の分解能を持つことが知られてからである²⁾。3次元構造の内部（薄い標本ではなく厚い標本）を観察でき、立体像を再構成することもできる。焦点から外れたところからの『ボケ』が消えることから、『ヌケ』の良いきれいな蛍光画像を取得できる性能の良い蛍光顕微鏡として利用する研究者も多い。

ボケ像を除去する方法はハードウェアで行う共焦点レーザー走査型顕微鏡や多光子励起レーザー走査型顕微鏡と、通常の蛍光顕微鏡でデジタルカメラにより取得した画像に対してソフトウェアで行うデコンボリューションがある。それぞれ原理は異なるが、いずれも焦点位置の光学的スライス画像が得られ、立体画像の構築ができる(図4)。

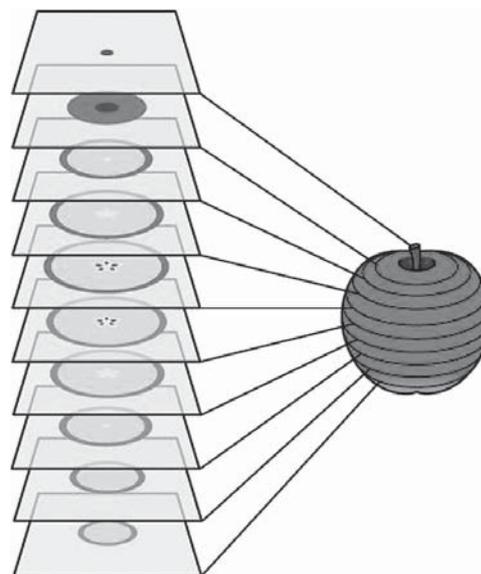


図4. スライス画像から立体再構成

立体画像を利用すると、見たい部分の位置関係を理解しやすくなり思考力を向上できる。

【スライス画像を得る四つの方法】

- A) **スライサーを使って標本の連続切片を作りそれぞれをプレパラートにし一枚ずつ画像にする** 画像を得たあと注目領域をトレースし立体再構成する。PCの実力が十分高くなった今ではトレースはせず得られた画像から見たい部分を抽出し単純化して再構成する。蛍光観察というより明視野観察画像で行う。蛍光画像に関してはつぎのB)～D)の方法で行う。
- B) **共焦点法により画像取得する** 焦点面以外からのシグナルを光検出装置の前の共焦点位置に置いたピンホールで除去することで、ピンホールを通り抜けることができる焦点面からの光だけで像を形成する。焦点位置を順に変え、レーザーを走査して画像を取得する。
- C) **多光子励起法で画像取得する** 多光子励起は光子密

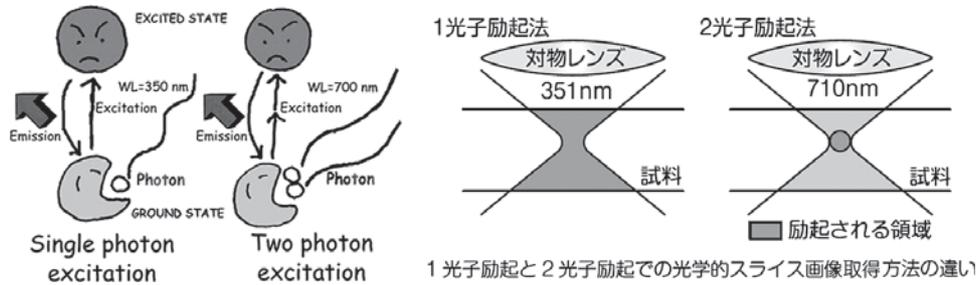


図5. 1光子励起と2光子励起.

左) 2光子励起では2倍の波長の光により励起する(光子の持つエネルギーが半分になるので励起のために光子が2個必要).

右) 1光子励起ではZ軸方向に標本全体にわたり、2光子励起では焦点位置だけで励起が起こる.

通常の蛍光観察は1光子励起で、スライス画像は共焦点法またはデコンボリューション法により取得する. 多光子励起は2光子励起法が一般的だが光子密度がさらに高くなれば光子3個のエネルギーを使う3光子励起も起こる.

度の高い焦点でだけで起こるので焦点以外の信号は混ざりこまない(図5). 焦点位置を変えて順に画像取得する. 組織内で散乱が少ない赤外光を使うので深部観察が可能となるのが特徴. 画像取得は走査による.

D) デコンボリューション法でスライス画像を得る

PSF (ポイント スプレッド ファンクション) ^{注1}を基に画像からボケ像を計算により除く. 立体再構成する場合は焦点を変えて得た全ての画像を画像改善する.

【コンピュータで3次元再構成する】

CT^{注2}やMRI^{注3}など医用画像で立体再構成は一般的に行われており、顕微鏡画像でも立体的位置関係を見る場合に有用である. 専用ソフトを利用して立体画像を得る.

A) のような切片から得た画像では重ねる画像間の位置あわせが重要になる.

光マニピュレーション

蛍光イメージングに関連して利用する手法のひとつで、微小な針を使って細胞レベルの微小領域にアプローチする手法をマイクロマニピュレーションというが、これを光で行うのが光マニピュレーションである(表1).

光を使うことで、直接標本に触れる物理的な手法に比

べて時間分解能をかなり良くすることができる. 細胞やまわりの溶液、容器に触れないのでマニピュレーションの前後で長時間にわたり計測する場合など特に重要である. 蛍光法と併せてよく利用されるのは、ひとつは光退色で、部分的に強い光を照射し退色を導く. もうひとつは光により、化学反応を誘発し活性化(生理活性の発現や蛍光を発するようになる光活性化)を誘導したり、構造変化による蛍光色の変換(光変換と呼ぶこともある)を誘導したりする. 通常の蛍光顕微鏡でも行われるが、レーザー顕微鏡を利用すれば簡単である(最近のレーザー顕微鏡はイメージング用のほかにもうひとつレーザー照射機能を持っている).

光活性化の実験では特別な試薬を用意しなくてもはいけなくて、何にでも適用できるというわけではない. 自分で合成できる人を除いて、利用できる市販の試薬は限られている.

【FLIP/FRAP (photo-bleaching)】

光退色を利用する(図6). 蛍光色素で染色した細胞膜とか細胞内に分布するタンパク質(蛍光タンパク質をつないでおく)に強い光を照射し部分的に退色する. その後退色した部分の蛍光が回復する様子を観察するのがFRAPになる. 分子の拡散のしやすさを計測する. 同じ部分で退色を繰り返す. 全体の蛍光色素が減っていき細胞が見えなくなってしまうのがFLIPである. FRAPと同様拡散のしやすさを計測する. 蛍光染色した細胞の画像取得を開始し途中で光退色を行う. その後さらに画像取得を継続する.

細胞膜の流動性や連続性、タンパク質の動きやすさを比較計測するために利用する手法である. 分子(色素)が拡散しないと退色したスポットの蛍光は回復しない.

【Caged化合物利用 (photo-activation)】

光活性化によるケージド解除(図7). 神経伝達物質、

表1. 生命科学研究で利用される光マニピュレーション

Laser Induction	遺伝子発現を熱で誘導
Laser Killing	ターゲットの細胞を熱で破壊
Laser Scissors	神経細胞などを熱で切断
Laser Tweezers	細胞やミトコンドリアを捕獲
Photo-bleaching	蛍光染色を部分的に退色
Photo-activation	不活性化した生理活性物質を活性化
Laser Inactivation	標的タンパク質を不活性化(CALI ^{注4})

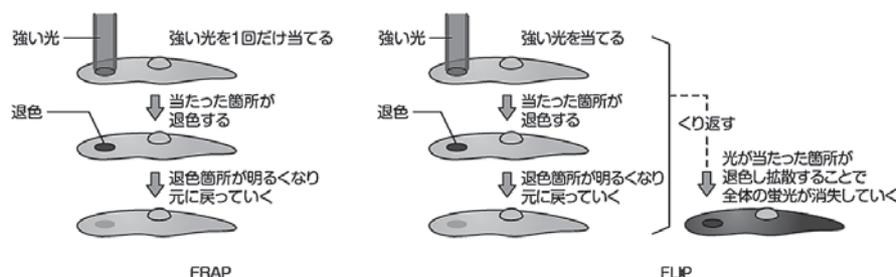


図6. 光退色を利用したアプリケーション.

左) FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). レーザ照射を1回行い退色部分の蛍光回復を観察。
 右) FLIP (fluorescence loss in photobleaching). レーザ照射を繰り返すと細胞内の蛍光色素が消失.

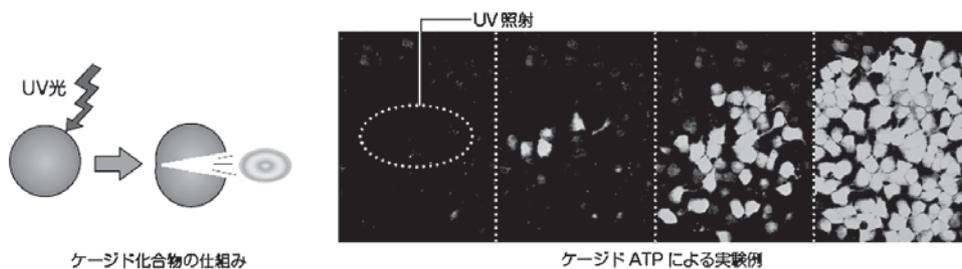


図7. ケージド化合物はUV光で活性化する. $[Ca^{2+}]$ プローブを導入したHeLa細胞はケージド解除により放出されたATPに反応し細胞内の $[Ca^{2+}]$ が上昇し明るくなる. ATPはすぐに拡散し, 応答が同心円的に広がる.

ヌクレオチド, 蛍光色素, 少し作用機序が異なるがカルシウムイオン, 水素イオンなどの生理活性を化学修飾により発揮できないようにしておき, 光照射 (通常紫外光) により化学修飾を壊し活性化する. PA-GFP (Photo-activatable GFP)^{注5} という光活性化する蛍光タンパク質もある. ケージド試薬を使えばターゲット領域に瞬時に生理活性を誘導できる. 実験は簡単ではないが, 2光子励起法により3次元的に狙った位置で解除も可能だ.

進展の著しい顕微鏡・蛍光色素

新しい蛍光染色プローブ 新規の蛍光色素が次々開発されている. 新しい機能を持ち, 蛍光色が選択でき, 励起波長がレーザにあわせられている¹⁾. 蛍光色素以外で蛍光染色する方法もある. Qdotと呼ばれる半導体の『かけら』は, といってもちゃんと丸く加工してあるが, ちょっと粒径が大きい(10~20 nm)が「退色しない蛍光色素」として登場した. 不満点はあるが, うまい使い方が見つけられれば, 退色しないというのは非常に魅力的である. 蛍光色は粒径に依存し, 大きいと蛍光波長は長くなる.

図8に示すように1)の蛍光色素の利用がいちばん繊細に染色できる. 蛍光ファロイジン染色は背景の『ヌケ

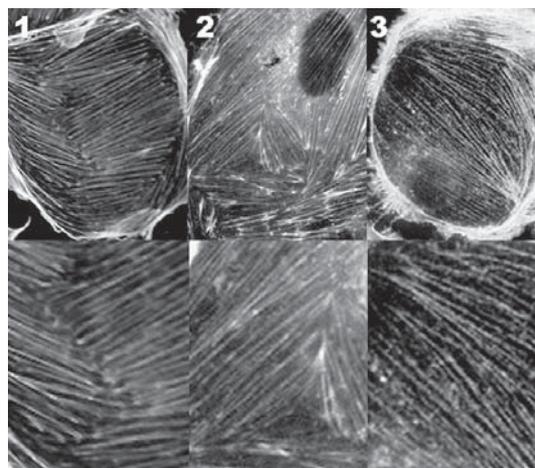


図8. PtK₂細胞アクチン繊維染色比較 (下段はそれぞれの上段画像の拡大).

1) ロダミンファロイジン (標識はテトラメチルロダミン), 2) 蛍光タンパク質 (標識はEYFP), 3) ビオチン化ファロイジン (標識はQdot525).

(黒さの程度)』が良く, 蛍光タンパク質は染まり方がなかなか良いが背景の『ヌケ』が悪い. Qdotは『ヌケ』は良いが, 染まり方がきたない(粒径が大きいので細かいところまで入り込みにくいと思われる). 蛍光タンパク

質はアクチン単量体との融合タンパク質だが、ファロイジンは重合したアクチン繊維とだけ結合し、フリーの色素は洗い流されているためと考えている(画像はそれぞれ平均的な染色レベルのものを示しているが、細胞によりストレスファイバの発達具合は大きく違っており、また染色程度もいつも同じというわけではない)。

新しいカメラ・顕微鏡 蛍光観察には高感度カメラが必須である。一般には白黒カメラで画像処理ソフトを併用して疑似カラー表示にする。超高感度EM CCD^{注6}では非常に滑らかできれいな画像が得られる。

最近、学会のワークショップで話題にとりあげられることが多くなってきた、光学の限界を超える分解能を持

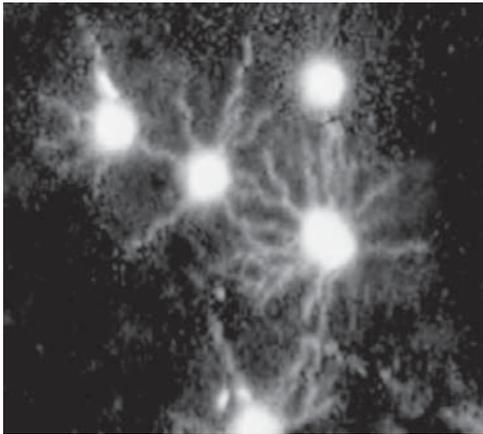


図9. サルモネラ菌べん毛が回転する様子を暗視野で観察。方向転換時、菌体から生えるべん毛はばらばらにひろがり1本ずつがそれぞれ回転している。再び泳ぐときはこれを束ねて回転する。

つ超解像顕微鏡を使うと水平解像度が20~200 nmくらいあるので大腸菌を数千分割して観察できる計算になる。

最後になったが、蛍光法以外ではあるが、太さが20 nmと光学分解能に満たない細菌べん毛の回転運動の暗視野での観察例を図9に紹介する。

最近では実験の手順書も充実しているので、それぞれの技術の進歩の過程や実験手法については引用の書籍を参照されたい³⁻⁵⁾。

文 献

- 1) Haugland, R.: The Handbook/A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed., Molecular Probes (2005).
- 2) 藤田哲也監修: 新しい光学顕微鏡「第一巻レーザー顕微鏡の理論と実際」「第二巻レーザー顕微鏡の医学生物学への応用」, 学際企画 (1995).
- 3) 高松哲郎編: わかる実験医学シリーズ「バイオイメージングがわかる」, 羊土社 (2005).
- 4) 高田邦昭ら編: 実験医学別冊「染色・バイオイメージング実験ハンドブック」, 羊土社 (2006).
- 5) 原口徳子ら編: 講義と実習「生細胞蛍光イメージング」, 共立出版 (2007).

^{注1} PSF (point spread function): ひとつの輝点から3次元的に広がる光の広がり方を示す関数。

^{注2} CT (computed tomography): X線による断層撮影。

^{注3} MRI (magnetic resonance imaging): 磁場内で電波を計測して非侵襲で体内を画像化する。

^{注4} CALI (chromophore assisted laser inactivation): 標識色素の発するフリーラジカルにより標的タンパク質を不活性化する。

^{注5} PA-GFP (photoactivatable-GFP): 光照射により非蛍光から蛍光性に変化する蛍光タンパク質 (GFP)。

^{注6} EM CCD (electron multiplying charge coupled device): CCD読み出し部に電子増倍機能が付いている。