

ナノワールドへの冒険

高田 英昭

本誌読者の方であれば、皆一度は顕微鏡を覗いたことがあるのではないだろうか？顕微鏡のレンズの向こうには、私達が普段目することがない未知の世界が広がっている。たとえば、池の水をスライドガラスの上に滴下して顕微鏡で観察すると、ゾウリムシ、ミドリムシ、ミジンコ達が元気に動き回る姿を見ることができ、私達を楽しませてくれる。今から300年以上も前に、レーウエンフックは自作した顕微鏡を用いてこうした微生物を初めて観察したが、その時の驚きは相当のものだったのであろう。その後、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡、原子間力顕微鏡などの多くの顕微鏡が開発され、ナノメートルオーダーのより小さな構造を見ることができるようになった。ここでは、こうした“ナノワールド”への冒険を可能としてきたものとして、前半では顕微鏡自体を開発したヘリウムイオン顕微鏡 (helium ion microscope, HIM)、後半では観察手法を改良した超解像度顕微鏡法を紹介する。

HIMは電子顕微鏡と同様の原理に基づく装置であるが、電子線の代わりにヘリウムイオンビームを照射する点に違いがある。電子線やヘリウムイオンビームを試料に照射すると、そのエネルギーを吸収して試料表面の原子から2次電子が放出される。発生する2次電子の量は試料表面の状態（たとえば凹凸）に依存するため、2次電子を検出することで試料の表面構造の情報を得ることができる。HIMの特徴の一つに高分解能があげられ、低加速電圧でも電子顕微鏡と同等の分解能を得ることができるため、損傷を受けやすい生体試料の観察に適している。生体試料の表面構造の観察には走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope, SEM) が用いられることが多いが、SEMによる観察では試料の導電性を高めるためのオスミウムによるコーティングが必要である。しかしながら、HIMはヘリウムイオンを照射することで試料に蓄積したプラスの電荷を電子ビームの照射により打ち消すことができるため、コーティングが不要であり、SEMよりも生体内の構造をより反映した観察が可能である¹⁾。

電子顕微鏡やHIMはサブナノメートルオーダーの高い分解能を持つが、生物試料の観察のためには試料の固定・脱水などの処理が必要であり、これらの処理過程で本来の構造が失われてしまう可能性がある。そこで、細胞内の分子を蛍光標識することで、細胞が生きたままの状態でも分子の動きや細胞内構造の変化を追うことが可

能な蛍光顕微鏡が発展してきた。しかしながら、蛍光顕微鏡で観察できる物の大きさには光学的な限界がある。顕微鏡の分解能は $\lambda/2N.A.$ (λ は光の波長、N.A.は対物レンズの開口数) で決定されるため、可視光での最大開口数1.4の対物レンズを用いて550 nmの波長の光で観察を行った場合の分解能は $550 \text{ nm}/(2 \times 1.4) = \text{約} 200 \text{ nm}$ となる。近年、この分解能の限界を超える顕微鏡法、超解像度顕微鏡法がいくつか報告された。構造化照明顕微鏡法 (structured illumination microscopy, SIM) は米国UCSF校のSedat博士、Gustafsson博士、Agard博士らが開発した手法で、スリット照射と呼ばれるスリット幅約0.2 μm 間隔の光を照射した際の光の干渉作用によって生じる縞模様 (モアレ効果) を利用する。これにより通常の顕微鏡では捉えられない微細な構造も粗いパターンとして検出されるため、そのパターンをコンピューターを用いた計算により復元することで限界分解能の2倍に当たる約100 nmの分解能を得ることができる²⁾。全視野顕微鏡をベースにしているため微弱な蛍光を検出することが可能である点や、他の超解像度顕微鏡法よりも用いることができる蛍光色素・タンパク質の種類が多いことが特徴である。SIMよりもさらに高い分解能を持つ顕微鏡がstochastic optical reconstruction microscopy (STORM) である³⁾。この手法では、少数の蛍光分子を光らせて画像を取得しては消光するという操作を何度も繰り返し、得られた画像を重ね合わせて演算処理によって超解像度の画像を構築する。その分解能は20 nmであり、なんと従来の蛍光顕微鏡の約10倍の分解能である。したがって、GFPなどの蛍光タンパク質を標的と融合させることで、超解像度でのライブイメージングが期待できる。

今回紹介した顕微鏡法以外にも、微細構造を可視化する方法はたくさん存在するが、研究目的によって最適な方法を選択することが重要であるため、研究で用いることを考えている方々は是非世に出ている顕微鏡法の総説などを参考にさせていただきたい⁴⁾。顕微鏡法の発展の勢いはとどまることを知らず、まだ誰も見たことがない“ナノワールド”への冒険はこれからも続きそうである。

- 1) Joens, M. S. *et al.*: *Sci. Rep.*, **3**, 3514 (2013).
- 2) Gustafsson, M. G. *et al.*: *Biophys. J.*, **94**, 4957 (2008).
- 3) Huang, B. *et al.*: *Science*, **319**, 810 (2008).
- 4) Schermelleh, L. *et al.*: *J. Cell Biol.*, **190**, 165 (2010).