S2M57

Single molecule imaging of dynamic molecular and cellular systems

○Yanagida Toshio (Graduate School of Frontier Bioscience, Osaka Univ.)

Single molecule detection (SMD) techniques have recently attracted a great deal of attention in life science. How advantageous is the SMD for investigations? Observing and manipulating biomolecules allows their dynamic behaviors to be directly revealed as has been demonstrated for motor proteins. Reactions of biological molecules are generally stochastic. Therefore, even if the reactions of molecules are initiated at the same time, they cannot be synchronized, so the dynamic behaviors of individual molecules are averaged and hidden in ensemble-averaged measurements. *In vivo*, biomolecules work in dynamic and complicated inhomogeneous systems, involving different kinds of molecules; cell-signaling proteins being the typical ones. It is difficult to quantitatively detect dynamic behaviors of target molecules in such systems by ensemble-averaged measurements. The SMD techniques are expected to overcome these difficulties. The SMD techniques have been successfully applied to study the dynamic properties of biological molecules such as motor proteins, enzymes, RNA polymerase and signaling proteins in living cells. Thus, single molecule imaging and nano-manipulation techniques have opened up a new era of biological research.

T.Yanagida : Single molecule imaging of dynamic molecular and cellular systems

S3S52

Multi Spectral Imaging による新しいアプリケーション

○中村 竜¹、川西 徹²、河合 洋² (¹カールツァイス AIM、²国立衛研 生物薬品部)

発光クラゲのタンパクを利用した GFP 及びその改変型 (BFP, CFP, YFP, DsRed などの所謂 xFPs) は、「細胞の任意の部位やタンパクなどに発現、発光させられる」、「細胞に対して毒性が少ない」などの理由から、ここ数年でメジャーな実験技法となっている。しかしそれぞれの蛍光波長がかなり強くオーバーラップしており、従来までのビームスプリッタ方式では、「ある特定の波長以下か以上か？」が分離基準となる為に、せっかくカラーバリエーションが豊富でも、xFPs どのの分離は事実上不可能であった。Carl Zeiss の新しい共焦点システム LSM510 META では、共焦点ピンホールを通過した蛍光信号を、時系列的にグレーティングによって分光し、32 個の検出器アレイ (META Channel) に投影して検出する。この方法の特徴は、1) 走査型顕微鏡なので各画素毎の信号が分光して検出される、よって画像を構成する全ての画素が波長情報を持っている、2) メカ的な稼動部位が無く電気的なスイッチの On / Off によって検出器を使うので、選択速度が速く再現性に優れる、3) 1 回の走査で各検出器が受け持つ波長領域 (10.7nm) を 8 個分まで取得可能で、スループットが良いのみならずサンプルに対するダメージも軽減される、などである。得られた画像は参照スペクトルを利用した近似計算によって、強くオーバーラップしている場合でも分離することが可能である (Linear Unmixing)。今回紹介する LSM510 META は、xFPs の組合せの問題を回避することが可能である。これにより蛍光プローブや蛍光タンパクの組合せの自由度が上がり、2 次元 3 次元の画像からより多くの情報が引き出せるようになった。また、発色させた物質の移動などを経時的にトレースして、そのローカリゼーションを時間的、空間的に調べるなど、生細胞における confocal imaging にも、今後ますます新たな可能性を提供すると期待される。

R.Nakamura, T.Kawanishi, H.Kawai : New Application Technique by Multi Spectral Imaging System

S3S51

イントロダクション -生細胞観察のための技術開発-

○宮内 崇行¹、岩根 敦子² (¹理研・脳科学・細胞機能探索、²阪大院・生命機能・ナノ生体科学)

現在の生細胞観察技術には進歩の余地がまだ大きい。例を挙げれば、多種の蛍光物質の同時観察を可能にして細胞機能の包括的な理解に貢献すること、信頼のおける定量解析がイメージングによって行えるようにすること、より安価に簡便に実験できること等が求められている。

今回、企業の研究/技術者の方々に各社の製品とその開発過程をご紹介をお願いした。上記課題の克服を目指した新技術が発表される予定である。ランチョンセミナーとは異なり一歩踏み込んだテクノロジーが話題となる。

生物物理学における細胞のイメージングは、技術の "leading edge" に乗って行われることが多く、機器の進歩が観察の進展に直結する。技術開発を課題にしている研究者に、また、現在の機器に不満を感じている方々に有用な内容となろう。研究の遂行上重要な、機械の扱いやすさに対する取り組みや、その他、観察機器の現状、開発の成果、今まで出来なかった何が「実際に」できるか等を取り上げていただく。測定機器の多くを輸入品に頼ることが問題視されるなか、「顕微鏡とその周辺」は日本の得意とする分野であって各企業の研究/技術の水準は高い。本シンポジウムがイメージング技術の最先端を俯瞰できる機会となることを期待している。

T.Miyauchi, A.H.Iwane : Introduction: Nobel Techniques for Live Cell Imaging

S3S53

COOLED-CCD ベースの白色光源を用いたコンフォーカル顕微鏡

○中田 竜男、遠藤 富男 (オリンパス光学工業 光学機器事業部 光機開発部)

蛍光観察用の共焦点顕微鏡は、ガルバノメータを用いたポイントスキャン方式と NIPKOW-DISK を用いたマルチポイントスキャン方式などのレーザを光源とした顕微鏡が発売されている。これらの共焦点顕微鏡では、励起にレーザを用いているため、市販されているレーザの波長に制限される、システム価格も高価になるといった欠点がある。そこで、我々は蛍光顕微鏡で使われている水銀やキセノン・ランプなどの白色光源を用いたコンフォーカル顕微鏡を開発した。このコンフォーカル顕微鏡は、蛍光顕微鏡の視野位置でスリットを描いた DISK を高速に回転することで、標本を対物の焦点位置にてスリットパターンで励起する。励起された標本からの蛍光は再度スリットパターンを通過することで共焦点効果を生み、スリットパターンと共役な位置に配置された Cooled CCD 上に投影され画像を構成する。DISK の回転により角度を変えながらスリットパターンが、標本に投影されるため 1 つの方向だけでなく、全ての方向にコンフォーカル効果をもつことができる。励起波長と測光波長のそれぞれは、蛍光顕微鏡で使われる蛍光フィルターキューブやフィルターチェンジャーなどによって個別に切り替え可能である。従来の NIPKOW DISK に比べ、DISK をスリットパターンにすることで製作も容易になった。このスリットを描いた DISK を対物レンズのエアリーディスクに合わせて交換すれば、標本の厚さに応じて焦点方向の共焦点効果を変えることも容易に行える。Deconvolution 処理を行うことなく光学的な断面像が得られ、三次元画像構築が可能である。この白色光源を用いたコンフォーカル顕微鏡で 350 μ m 厚の標本を 1 μ m ステップにて 3 分間で三次元画像が構築出来、厚い標本においても画像取得が出来ることが証明された。

T.Nakata, T.Endo : Fluorescence Confocal Microscope for using white light source based on Cooled-CCD