

## APPLICATION NOTE

## 超解像共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R with NSPARC

# 超解像イメージングによる ミトコンドリア微細構造の定量解析

ミトコンドリアは、ATP産生やアポトーシスといった生命活動に不可欠な機能を担う細胞内小器官である。その形態はダイナミックに変化することで知られ、ミトコンドリアは細胞の中で分裂や融合を繰り返す。また、ミトコンドリアは外膜と内膜の二重膜で構成され、内膜は内部（マトリクス）に向かって陥入したクリステと呼ばれる構造を取っている。これらミトコンドリアの形態や構造と細胞の活性（Viability）との間には相関関係があることが知られており、現在ミトコンドリアの形態や構造とヒトの疾患との関連に着目した研究が展開されている。

本アプリケーションノートでは、超解像共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX R with NSPARC (Nikon SPatial ARray Confocal) を用いたミトコンドリア観察の実例を紹介する。NSPARCと高速レゾナントスキャナーを組み合わせることで、微細な構造を持つクリステや、形態のダイナミックな変化が鮮明に観察できた。従来の共焦点レーザー顕微鏡と同様の操作感で簡単に超解像画像を取得できるNSPARCは、NIS-Elementsソフトウェアによる解析と組み合わせることで学術研究だけではなく、医療や創薬スクリーニングといった応用分野への適用も期待される。

キーワード：共焦点レーザー顕微鏡システム、超解像イメージング、ライブセルイメージング、ミトコンドリア

## 実験1の概要

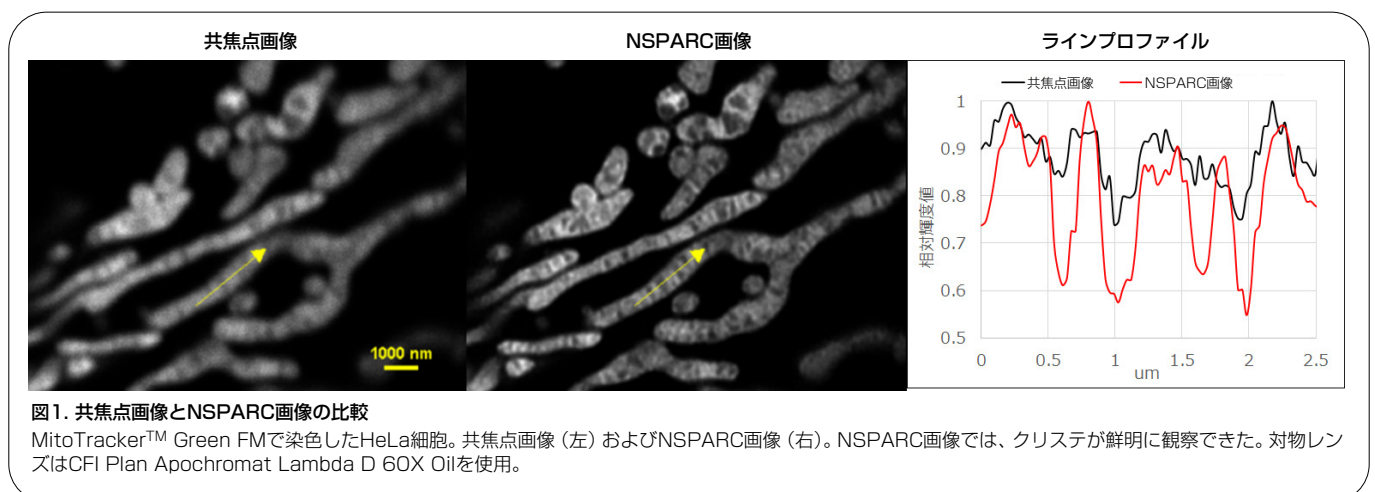
ミトコンドリアは、細胞の中でダイナミックに動き回り、分裂と融合を繰り返している。これらのイベントは秒単位で起こるため、ミトコンドリアの動態を正確にとらえるには高速の超解像イメージングが不可欠である。またタイムラプス撮影においては、光毒性や蛍光プローブの退色も大きな問題になる。

本実験では、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で2日間培養したHeLa細胞のミトコンドリアを、MitoTracker™ Green FMで染色し、超解像共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX R with NSPARCでライブセルイメージングを行った。高速撮影および光ダメージと退色の低減のために、レゾナントスキャナーを用いた。

## 観察結果

共焦点画像とNSPARCで取得した超解像画像の比較を図1に示す。共焦点画像では鮮明にとらえられなかった微細構造クリステが、NSPARC画像では鮮明にとらえられた。その結果、ミトコンドリアの外形（長さ、太さ）はもちろんのこと、新たにミトコンドリアの活性との相関が注目されるクリステ構造（密度、縮間隔）も定量化出来るようになった。

続いて、NSPARCによりミトコンドリアのタイムラプス撮影を行った（図2）。ミトコンドリアは活発に形態を変化させるため、撮影速度が遅いとブレた画像になり分解能の低下を招く。本タイムラプス撮影では高速レゾナントスキャナーを用いてタイムラプス撮影（1024 x 512 pixel、3.8 frame/sec、interval 3 sec）を行った。図2にそのムービーの一部を示している。従来の共焦点顕微鏡ではとらえることが難しかったミトコンドリアの分裂、融合の瞬間の微細な形態変化も、簡単に観察できるようになった。



### NSPARC画像

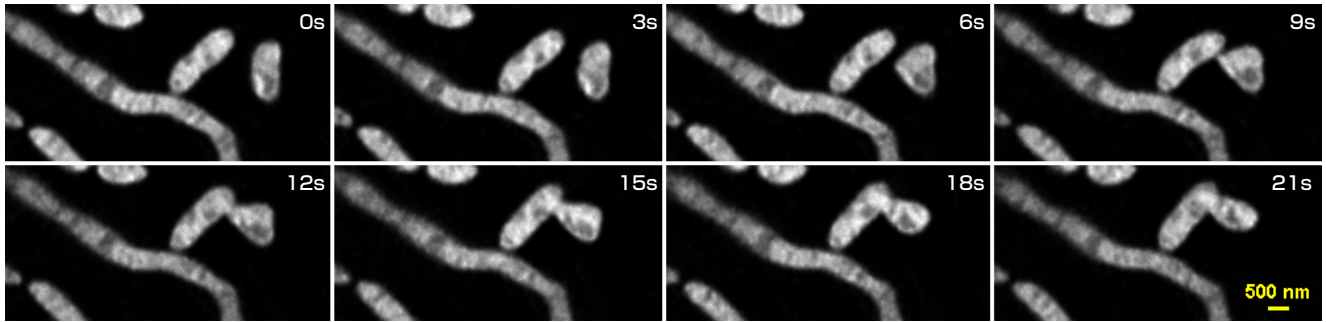


図2. レジナントスキャンを用いた超解像画像

3.8 frame/sec. interval 3 secのタイムラプス画像を抜き出して表示。ミトコンドリアが変形しながら融合していく様子が細部までとらえられている。対物レンズはCFI Plan Apochromat Lambda D 60X Oilを使用。

### 実験2の概要

固定した免疫染色サンプルの観察を行った。HeLa細胞の微小管をAlexa Fluor™ 488、ミトコンドリア外膜をAlexa Fluor™ 568、核をDAPIで染色した。励起波長405 nm, 488 nm, 561 nmでLine sequentialの多色撮影を行った。その後、取得画像に対しNIS-Elements解析モジュール(GA3)を用い、定量化を実施した。

### 観察結果

NSPARC画像では、微小管およびミトコンドリア外膜のコントラストが上がり、微細な構造をより鮮明にとらえることができた

(図3)。その結果、定量化の際にも正確な数値化や局在解析が可能となる。各染色の定量化結果を比較したところ、微小管領域は、総延長距離がミトコンドリアの約4倍、面積が1.5倍だった。一方幅(太さ)に関しては、ミトコンドリア領域が微小管の3.6倍であった。

上記のような定量化は、イメージングを用いた解析において必須となりつつある。NSPARCによる超解像イメージングとNIS-Elementsによる解析を組み合わせることで、従来よりも正確かつ詳細な画像解析が可能となり、高い再現性が求められる創薬開発などへの応用が期待される。

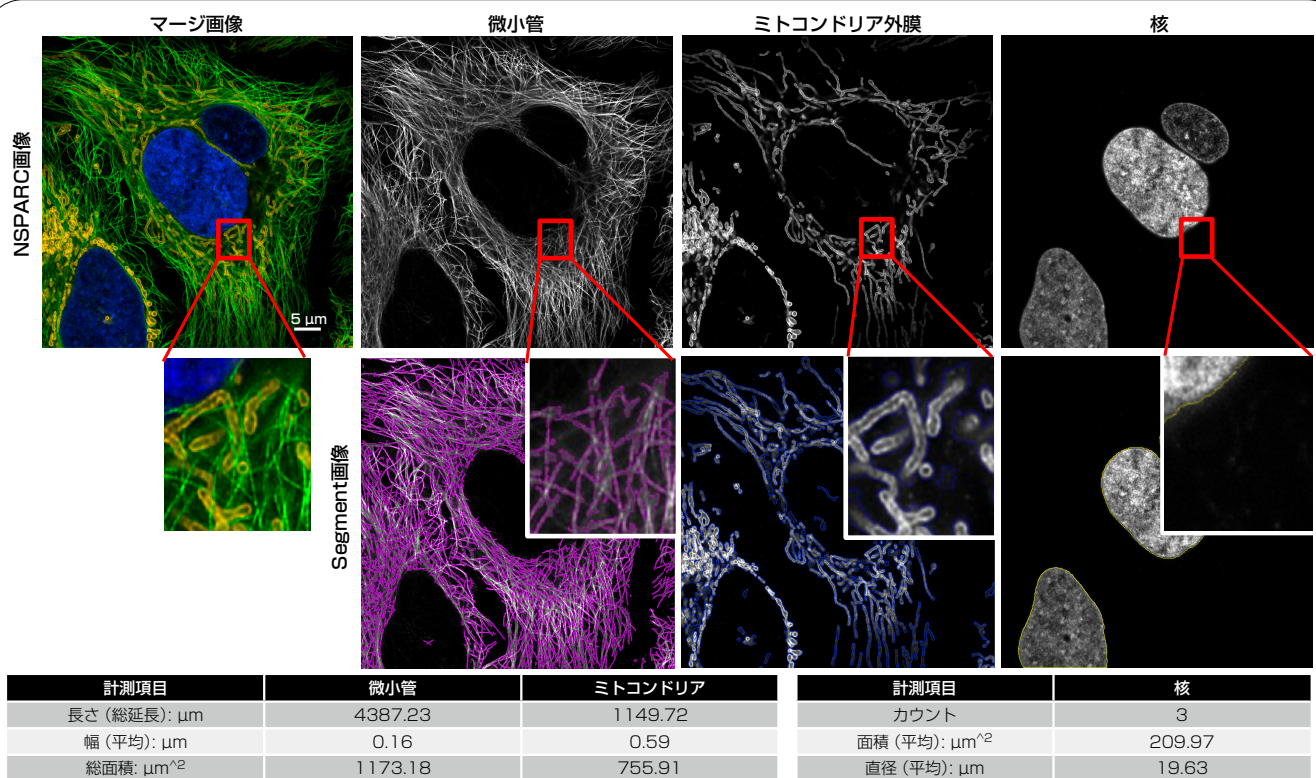


図3. 免疫染色サンプルの観察

固定したHeLa細胞を用いた免疫染色サンプル。微小管は $\alpha$ -Tubulin抗体(abcam #ab6160)、ミトコンドリア外膜はTOMM20(abcam #ab78547)を用い、二次抗体にはそれぞれAlexa Fluor™ 488(Invitrogen #A-11006)、Alexa Fluor™ 568(Invitrogen #A-11011)標識抗体を用いて染色した。対物レンズはCFIアポクロマート Lambda S 60X Oilを使用。

画像上段: 各染色画像、下段: Segment画像、表: NIS-Elementsによる定量化結果

### 製品情報

#### 超解像共焦点レーザ顕微鏡システム AX/AX R with NSPARC

超解像ディテクターNSPARCは、25個のアレイディテクターにより、従来の共焦点画像よりも優れた解像度を高S/N比で実現します。



#### CFI プランアポクロマート Lambda D 60X Oil

像平坦性に優れ、FOV25の広視野の端まで均一な画像を実現。幅広い波長域での色収差補正により、多色イメージングに最適です。

・ NA: 1.42, WD: 0.15mm

