

4B06

低温下における単一タンパク質分光のための反射対物レンズの開発

(東工大物理) ○藤原正規、藤芳 暁、松下道雄

[序] 液体ヘリウム温度における単一タンパク質分光は、集団平均と熱揺らぎにより隠されてしまうタンパク質の構造情報の詳細が得られる手法である。一個のタンパク質からの微弱な蛍光を効率良く検出するためには、高い開口数(NA)の対物レンズを試料の直近に配置する必要がある。加えて、試料を液体ヘリウム温度に確実に保つためには試料と対物レンズを共に液体ヘリウム中に配置しなければならない。この条件下では色収差や球面収差が補正された組レンズが使用できないため、液体ヘリウム温度の単一タンパク質分光は非球面単レンズを用いて行われてきた。しかし、単レンズでは色収差が避けられないので、測定波長域は近赤外に制限されていた。そこで、我々は低温での色収差の問題を解決するために、独自に一体成形反射対物レンズ(焦点距離 $f=4\text{ mm}$, $\text{NA}=0.6$)の開発を行い[1]、温度 1.5 K で単一タンパク質の可視蛍光スペクトルの測定に初めて成功した[2]。

本講演では、アミノ酸残基などの重要な発色団が存在する紫外域の単一タンパク質分光を実現するための対物レンズを開発したので報告する。紫外域での実験では励起光によって発生する大きな背景光が問題となるため、対物レンズの球面収差を補正して集光効率をさらに向上させることが必須となる。そこで、球面収差を補正する方法を検討し、上記の対物レンズを上回る集光効率を持つ対物レンズの開発に成功した[3]。

[一体成形反射対物レンズ] 図 1 に一体成形反射対物レンズを示す。この対物レンズでは、合成石英の表面に蒸着されたアルミニウム膜が、中心 O_M を共有する半径 R_1 の凸球面鏡と半径 R_2 の凹球面鏡からなる反射光学系を形成している。合成石英は熱膨張率が小さく、二枚の球面鏡が合成石英と一体となっているため、低温下でも両球面鏡の光軸がずれない。また、合成石英界面での光の屈折から生じる色収差を実効上無視できるように設計した。具体的には、点 O_f からの光は中心 O_f 、半径 R_3 の球面を、光軸に平行な光線は平面 S を、それぞれ垂直に通過するようにした。

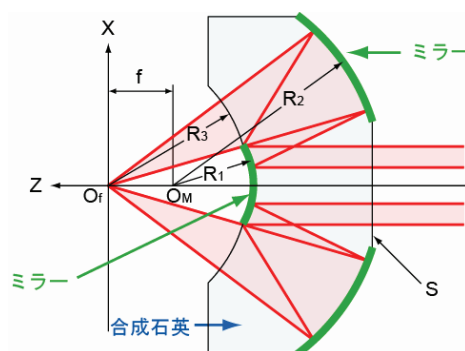


図 1: 一体成形反射対物レンズ。合成石英の表面にアルミを蒸着し、二枚の球面鏡を形成している

[球面収差の補正] 一般にレンズの球面収差は、幾何光学的に考えると、レンズのサイズに比例する。一方、回折像の大きさは NA や波長に依存し、レンズのサイズに依存しない。従って、球面収差はレンズのサイズを小さくすることで補正することができる。この関係を確認するために、すでに報告した $f=4\text{ mm}$ の反射対物レンズと、図 1 のデザインを保ったまま全体の大きさを半分にした $f=2\text{ mm}$ の反射対物レンズの点像分布関数(PSF)を計算した[4]。まず、図 2a に円環状開口のフラウンホーファー回折像を示す。これは球面収差が存在しない理想的な反射対物レンズの PSF に相当し、 NA や波長に依存するが、対物レンズの大きさに依存しない。次に図 2b,c に $f=2\text{ mm}$ 及び 4 mm の反射対物レンズの PSF を示す。図 2a-c は光の波長を 400 nm として計算した。 $f=4\text{ mm}$ の対物レンズの PSF(図 2c)では、フラウンホーファー回折像(図 2a)と比較して、球面収差によって周囲のリングに光が散逸していることが分かる。一方、 $f=2\text{ mm}$ の対物レンズの PSF(図 2b)では、像の中心に光が集中しており、無収差のフラウンホーファー回折像に近い形状が得られている。

以上の計算結果から、対物レンズの PSF は、図 1 の反射対物レンズのサイズを小さくするほどフラウンホーファー回折像に近づくと考えられる。しかし、対物レンズのサイズを小さくすると加工精度が問題となり、設計通りの集光効率を得られなくなる。そこで我々は加工精度を保持できる最小のサイズを検討し、図 3 に

示す $f = 2 \text{ mm}$ の反射対物レンズを実際に製作することができた。この反射対物レンズの性能を評価するため、実験的に点像分布関数を求めた。図 2d,e は $f = 2 \text{ mm}$ 及び 4 mm の対物レンズで測定したポリスチレンビーズ散乱像である。照明光の波長は 400 nm 、温度は 1.5 K で測定した。得られた結果はそれぞれの PSF に対応する。実験的に得られた PSF は前述の計算結果と良く一致しており、対物レンズのサイズを小さくすることで、集光能力が向上した。

[色収差] $f = 2 \text{ mm}$ の反射対物レンズは色収差に関しても、温度 1.5 K で紫外域まで問題なく使えることを確認した。図 4 に示すように、実測したビーズ散乱像は近赤外(波長 980 nm) から紫外(360 nm)まで波長に依らず回折限界程度まで絞れている。今後はこの反射対物レンズを用いて低温における単一タンパク質の紫外蛍光スペクトル検出の実現を目指す予定である。

[1] S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, C. Kim, M. Matsushita, A. M. van Oijen, and J. Schmidt, *Appl. Phys. Lett.*, **91**, 051125 (2007)

[2] S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, and M. Matsushita, *Phys.Rev.Lett.* **100**, 168101 (2008)

[3] M. Fujiwara, S. Fujiyoshi, and M. Matsushita, *J. Opt. Soc. Am. B* **26**, 1395 (2009)

[4] 点像分布関数は図 1 のように光軸に平行な光線がレンズに入射したときの焦点面での強度分布を表す。

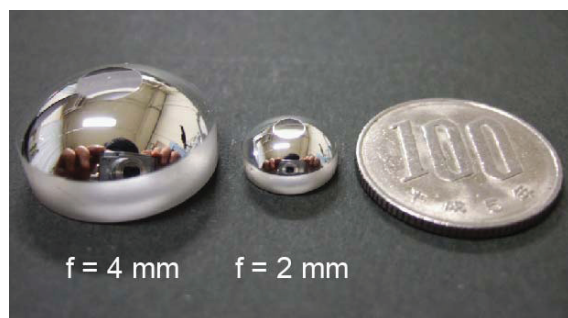


図 3: 製作した2つの反射対物レンズの写真。左は最初に製作した焦点距離 $f = 4 \text{ mm}$ のレンズで、100 円玉程度の大きさ。中央は今回新たに製作した $f = 2 \text{ mm}$ の反射対物レンズ。

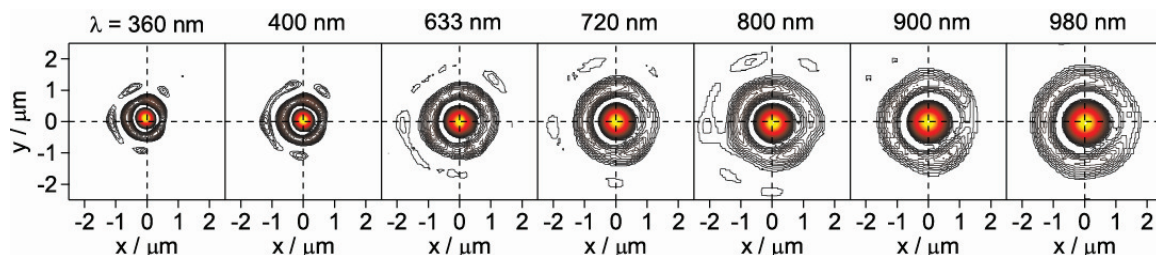
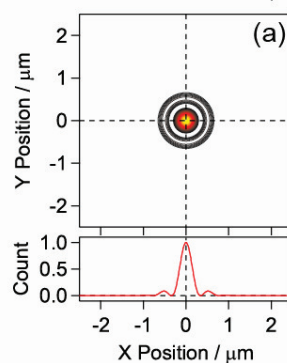
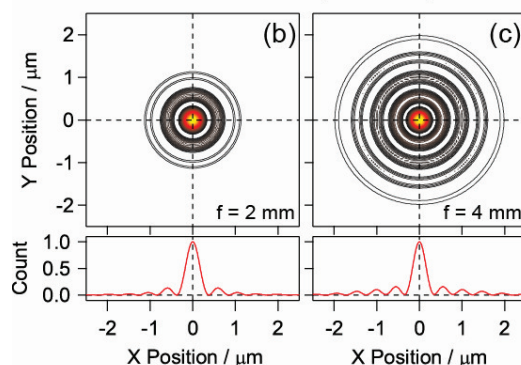


図 4: 温度 1.5 K で焦点距離 2 mm の反射対物レンズを用いて測定したポリスチレンビーズ散乱像。試料—対物レンズ間距離を固定して入射光波長のみを $360 \sim 980 \text{ nm}$ と切り替えて測定した。

フラウンホーファー回折像 (計算結果)



点像分布関数 (計算結果)



温度 1.5 K におけるビーズ散乱像 (実験結果)

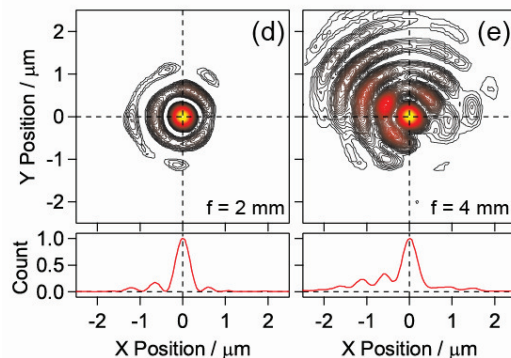


図 2(a): 円環状開口のフラウンホーファー回折像。波長 400 nm で計算。(b), (c): 焦点距離 2 mm 及び 4 mm の反射対物レンズの点像分布関数。波長 400 nm で計算。(d), (e): 製作した焦点距離 2 mm 及び 4 mm の反射対物レンズを用いて測定したポリスチレンビーズ散乱像。温度 1.5 K 、波長 400 nm で測定。