

2B11 温度数ケルビンのタンパク質 1 分子分光装置の機械的安定性の評価

東工大 物理 日野原 拓也・濱田 裕紀・松下 道雄・○藤芳 暁

生体試料の観察において、Far-field 蛍光顕微鏡は、非接触で、試料の厚さ方向を含む 3 次元情報が得られ、かつ一分子レベルの感度を持つ強力な方法である。しかし、光の回折現象のために、分子やタンパク質の大きさに比べて、1~2 桁空間分解能が低いという原理的な制約がある。例えば、1 個の分子が発する波長 λ の蛍光を、理想的な蛍光顕微鏡で観測した場合、得られる蛍光画像は、図 1A の赤線のようなエアリー関数となる。原点 ($x = 0$) から見て、初めて強度がゼロになる距離 r_{1st} は第 1 暗環半径と呼ばれ、 $r_{1st} = 0.61 \lambda \text{ NA}^{-1} \text{ M}$ で表される (NA: 対物レンズの開口数、M: 顕微鏡の倍率)。レイリーの定義では (図 1A)、二つの分子からの蛍光像の距離 r_{AB} が r_{1st} に一致する場合 ($r_{AB} = r_{1st}$) が、それぞれの像が分離して見える限界であるとし、これを空間分解能としている。よって、試料位置では M を割り算した距離 $r_{1st,obj} = 0.61 \lambda \text{ NA}^{-1}$ がこれに対応する。NA の限界値は ~ 1.5 であり、 $\lambda = 0.50 \mu\text{m}$ とすると、 $r_{1st,obj} \sim 0.20 \mu\text{m}$ となる。また、図 1B に示したスパローの定義 ($r_{AB} = 0.78 r_{1st}$) では、 $r_{1st,obj} \sim 0.16 \mu\text{m}$ となる。この分解能 $r_{1st,obj}$ は、分子やタンパク質の大きさに比べて、1~2 桁大きい。

2 分子間の距離で定義される空間分解能に対して、蛍光像の位置決定の精度は光子数ゆらぎで決まり、光子数の平方根に比例して精度が向上する[1]。もし、二つの分子を別々に蛍光させることが出来れば、スパロー限界はもとより、 $r_{AB} = 0.1 r_{1st}$ の条件 (図 1C) でも、それぞれの位置の違いを蛍光イメージから求めることができる。

このような 1 分子の位置決定は、1995 年に T. Schmidt らによって実験的に示された。彼らは、室温下 (300 K) で、色素 1 分子の位置を 30 nm ($r_{AB} \sim 0.1 r_{1st}$ の条件) の精度で決定した[2]。現在では、顕微鏡の機械的ドリフトを補正することで、分子の大きさと同程度 ($< 1 \text{ nm}$, $r_{AB} < 0.01 r_{1st}$ の条件) の精度で色素 1 分子の位置を決定できる方法や[3]、STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) という光学課程を用いて、回折限界よりも近接した複数の分子の位置を $< 10 \text{ nm}$ の精度で決定する方法[4]が開発されている。一方、2002 年、Matsushita らは、温度数ケルビンでは、回折限界内にある数百個の分子の位置を数 nm の精度で決定した上で、それぞれの分子のスペクトルと配向を 1 分子ごとに取得できることを報告している[5, 6]。

室温、低温を問わず、これらの実験の成功の鍵は、対物レンズと試料との相対位置のゆれを、目的とする精度よりも高くすることにかかっている。しかし、一般に、蛍光顕微鏡の機械的安定性は回折限界 (数百 nm) を基準として設計される場合が多く、決定したい位置精度とは 1 桁以上の開きがある。そこで、我々はポリスチレンビーズの位置決定を用いて、蛍光顕微鏡の機械的安定性を $\pm 0.1 \text{ nm}$ の精度で定量的に決定できる光学系を作製した。その結果、温度 1.5 K の 1 分子蛍光顕微鏡の機械的ゆれが、15 分にわたり $\pm 1 \text{ nm}$ に抑制できることを実験的に確かめたので報告する。

【検査光学系の概要】 図 2A に、作製した光学系を示す。超流動ヘリウム恒温槽はこれまで数ケルビンのタンパク質 1 分子分光に用いてきたものである[7 - 9]。これは、文献 5,6 で用いたものとほぼ同一の設計で作成したものであり、機械的な安定性も同程度であると考えられる。試料と対物レンズ (反射型、焦点距離 $f = 2 \text{ mm}$ [10], $\text{NA} = 0.6$) は超流動ヘリウム中に配置した。試料には、直径 100 nm のポリスチレンビーズをスピコートしたガラス基板を用いた。コートの際に、面密度を $10^{-3} \mu\text{m}^{-2}$ に調整することで、個々のビーズの画像を分離して観測出来る条件にした。試料の後方からレーザー光 (633 nm) を集光し、ビーズからの散乱光を対物レンズで集め、 $f = 200 \text{ mm}$ の結像レンズで CMOS カメラ (ARTCAM-130MI-BW, フレームレート: $> 15 \text{ fps}$, 画素サイズ: $5.2 \mu\text{m} \times 5.2 \mu\text{m}$) に結像させた。この結像レンズと CMOS カメラはアルミで一体成形したホルダーに固定し、特に、CMOS カメラはエポキシ樹脂で接着することで、結像レンズと CMOS カメラの相対位置の変化を $\pm 10 \text{ nm}$ に抑えた。図 2A の光学系は倍率 100 倍の光学顕微鏡になっている。このため、結像レンズと CMOS カメラの機械的ドリフトが $\pm 10 \text{ nm}$ であれば、試料位置での機械安定性の検査精度が $\pm 0.1 \text{ nm}$ とする。

図 2B に、図 2A の顕微鏡で得られたビーズの散乱光イメージを示す。原点にあるのが、1 個のビーズからの散乱光である。図 2A のような配置では、ビーズで散乱されたレーザー光

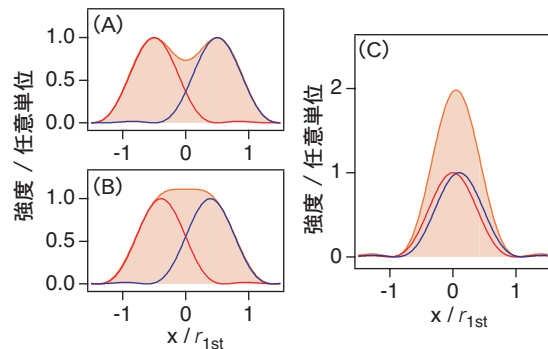


図1. 二つの分子からの蛍光像. 赤と青の実線がそれぞれの分子からの蛍光像、橙で塗りつぶした実線が実際に観測されるそれぞれの和の蛍光像である. (A) レイリー限界: $r_{AB} = r_{1st}$ (B) スパロー限界: $r_{AB} = 0.78 r_{1st}$, (C) $r_{AB} = 0.1 r_{1st}$.

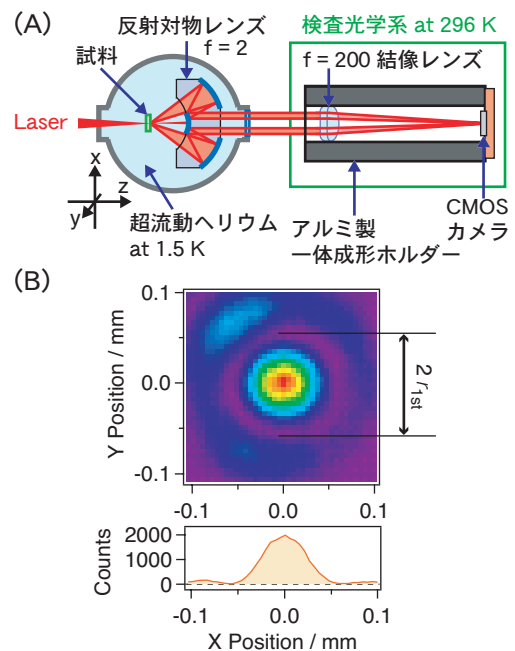


図2. 光学系の模式図. (A) 1.5 K のタンパク質 1 分子測定装置の機械的ドリフトの検査の配置. X 軸は定盤に対して水平方向、Y 軸は鉛直方向とする. (B) CMOS カメラで観測されたビーズの散乱光像.

は反射対物レンズの小さい球面鏡で遮蔽されるために観測されない。このため、得られる散乱像は図 2B のような暗視野の画像となる[10]。解析では、直径 $2r_{1st} = 0.11$ mm の円（第一暗環）の中の信号のみを用いて 1 次のモーメントを求め、これをビーズ散乱像の位置 (x, y) とした。試料基板とビーズとの相対位置は数ケルビン下であるため、固定されている。よって、光学系で検出されるビーズ散乱像の動きは、試料と対物レンズとの相対位置の変化によるものと考えられる。

【検査光学系の安定度の評価】 低温での光学顕微鏡の検査を行う前に、検査光学系（図 2A、緑の枠内）の安定度を定量的に検査した。検査には、理想的な平面波が必要である。そこで、検査光学系のデザインを元にした光源を作製した（図 3A、赤の枠内）。この光源は直径 $10 \mu\text{m}$ ピンホールとコリメータレンズからなり、検査光学系との違いは、CMOS カメラがピンホールになっただけである。ピンホールはカメラより安定に保持できるので、その機械的安定度は、検査光学系と比べて、同程度以上である。さらに、直径 $10 \mu\text{m}$ ピンホールに対して、十分に大きいスポット径 $600 \mu\text{m}$ のレーザー（波長 633 nm ）を入射することで、レーザーのビーム位置安定性が検査に影響しないようにしている。

検査結果を図 3B に示す。1 点あたり 300 回の測定をおこない、その標準偏差を 1 フレームあたりの時間 t_{frame} に対してプロットした。図中の最小の $t_{\text{frame}} = 0.06$ 秒でも、 $r_{1st} (= 0.05 \text{ mm})$ に比べて 3 桁高い精度で位置を決定できる。さらに、 t_{frame} を 1 秒まで長くしていくと、CMOS 上での標準偏差は、時間の平方根に反比例して減少し、最終的に $\pm 10 \text{ nm}$ になった。これは、 $t_{\text{frame}} < 1$ 秒では、偏差の主要因が光子数ゆらぎによることを意味している。一方、 $t_{\text{frame}} > 1$ 秒では、偏差は時間と共に増加した。長時間の領域に、あらわれる偏差は設置する定盤の剛性を向上させると減少するため、主に、定盤の歪みに由来すると考えられる。図 3B の結果から、以下の検査は $t_{\text{frame}} = 1.5$ 秒で行うことにした。この場合、CMOS 面でのビーズ散乱像の位置の標準偏差は $\pm 10 \text{ nm}$ であり、試料面では $\pm 0.1 \text{ nm}$ の精度になる。

【数ケルビンの蛍光顕微鏡の機械的ドリフトの評価】 図 4A に、図 2A の光学系を用いて測定した対物レンズと試料との機械的ゆれの結果を示す。右の縦軸は CMOS 面で検出されるビーズ散乱像の位置の標準偏差であり（図 3B の縦軸と同じ物理量）、これから見積もった対物レンズと試料との相対位置の変化の標準偏差を左の縦軸に示す。図の横軸の原点はヘリウムが超流動状態になった時である。定盤に対して、水平、鉛直方向 (x, y) 共に、ヘリウムが超流動状態になってから数時間で機械的安定性が增加していき、5.7 時間後に $\pm 1 \text{ nm}$ に到達した。この条件であれば、文献 5, 6 の数 nm の位置決定は十分に実行可能である。

最高の性能となった 5.7 時間後における、基板と対物レンズとの相対位置の時間変化を図 4B, C に示す。図から、 y 軸は x 軸に比べて、約 4 分間隔の数 nm の揺れがある。この周期は部屋のエアコンの ON OFF の周期と一致しており、部屋の温度変化により恒温槽に歪みが生じたためと考えている。

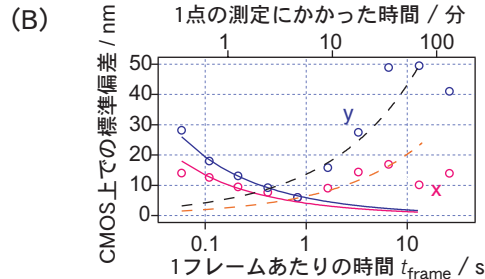
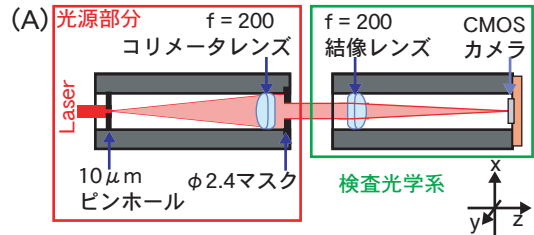


図3. 高精度位置決定装置。(A) 検査光学系の安定度の測定装置。(B) 検査結果。1点当たり300回の位置測定を行いその標準偏差を t_{frame} に対してプロットした。図中に、実線で $1/\sqrt{t_{\text{frame}}}$ 、破線で $\sqrt{t_{\text{frame}}}$ の曲線をあらわした。

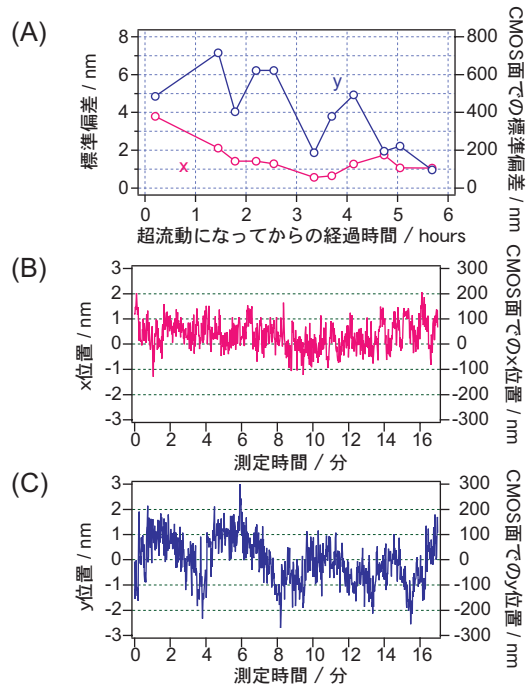


図4 (A) 基板と対物レンズとの相対位置の標準偏差 at 1.5 K. $t_{\text{frame}} = 1.5$ 秒で850回の測定を行いその標準偏差をプロットした。(B and C) 最も安定した時 (5.7時間後) の実測値。右の縦軸がCMOS面で実際に観測されたビーズの動きであり、左の縦軸は倍率 $M = 100$ を割り算して見積もった対物レンズと試料との相対位置の変化。

1. Bobroff; *Rev. Sci. Instrum.*, **57**, 1152 - 1157 (1986).
2. Th. Schmidt, G.J. Schütz, W. Baumgartner, H.J. Gruber, H. Schindler; *J. Phys. Chem.*, **99**, 17662 - 17668 (1995).
3. A. Pertsinidis, Y. Zhang, S. Chu; *Nature*, **466**, 647-651 (2010).
4. M.J. Rust, M. Bates, X. Zhuang; *Nature Methods*, **3**, 793 (2006).
5. M. Matsushita, A. Bloëß, Y. Durand, J.Y.P. Butter, J. Schmidt, E.J.J. Groenen; *J. Chem. Phys.*, **117**, 3383 - 3390 (2002).
6. A. Bloëß, Y. Durand, M. Matsushita, H. van der Meer, G.J. Brankenhoff, J. Schmidt; *J. Microscopy*; **205**, 76 - 85 (2002).
7. S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, M. Matsushita; *Phys. Rev. Lett.* **100**, 168101 (2008).
8. S. Fujiyoshi, Y. Furuya, M. Iseki, M. Watanabe, M. Matsushita; *J. Phys. Chem. Lett.*; **1**, 2541 - 2545 (2010).
9. S. Fujiyoshi, M. Hirano, M. Matsushita, M. Iseki, M. Watanabe; *Phys. Rev. Lett.* **106**, 078101 (2011).
10. M. Fujiwara, S. Fujiyoshi, M. Matsushita; *J. Opt. Soc. Am. B*, **26**, 1395 - 1399 (2009).