

Reflecting Objective with a numerical aperture of 0.97
and its application to single-molecule fluorescent imaging at 1.5 K

(Tokyo Tech.) ○Hironori Inagawa, Michio Matsushita, Satoru Fujiyoshi

【序】近年、生化学の発展によりタンパク質の特定の部位に複数の異なる色で光る蛍光色素をつけることが可能になっている[1-2]。もしこれらの色素の三次元相対位置を数 nm の精度で決定できれば、タンパク質の立体構造を 1 分子観測できるはずである。これに向けて我々は 2007 年に液体 He 中で動作する球面型反射対物レンズを開発し[3]、温度 1.5K でのタンパク質 1 分子分光に成功した[4-5]。図 1A に球面反射対物レンズを示す。このレンズは、図の右側から平面波を入射させると球面鏡 1、球面鏡 2 の順に反射し、試料上に集光する。2 枚の球面鏡を用いていることと、石英ガラスの界面を 2 回通し屈折をキャンセルさせていることにより、色収差をゼロにする設計になっている。さらに、2 枚の球面鏡の間を熱膨張係数の小さい石英ガラスで満たすことで、温度数 K でも動作する。この球面型反射対物レンズを使用した 3 次元レーザー走査型顕微鏡での Qdot705 の蛍光測定によって、波長 635 nm において焦平面(XY)内の位置決定精度 3 nm、光軸(Z)方向では 18 μm を得た[6]。対してタンパク質分子の大きさは数 nm であり、その立体構造を測定するためには主に光軸方向の分解能が不足している。顕微鏡の位置決定精度 σには次式が成り立つ[7]。

$$\sigma \propto \frac{\Gamma}{\sqrt{N}} \propto \frac{\Gamma}{\sqrt{\Omega t}} \quad \dots (1)$$

ここで、Γは顕微鏡の空間分解能、Nは検出する光子数、Ωは対物レンズの有効立体角、tは積算時間である。すなわち、位置決定精度の改善には、Γを小さく、Ωを大きくすればよく、これらの要求は対物レンズの開口数 NA を大きくすることで同時に満足される。これまで用いていた球面型反射対物レンズの開口数 NA は He 媒質中で 0.53 であり、原理限界 1 と比べると改善の余地を残している。2 枚の球面鏡のみで NA を上げようとする、球面収差が原因で集光効率はむしろ悪化する。そこで非球面鏡を用いた新たな極低温用反射対物レンズを開発し、NA = 0.97 に向上したので報告する。

【レンズ開発】図 1B に開発した非球面型反射対物レンズを示す。合成石英で一体成形された非球面鏡と球面鏡で集光する。非球面鏡は 2 次曲面に 8 次までのべき級数項を加えたもので、球面鏡による球面収差をキャンセルするように最適化することで、NA = 0.97 を有しながらも回折限界性能で集光することが可能である。この設計は、現行の光学研磨技術で実現可能な限界値にしている。

NA を大きくしたことで非球面型の面内(XY)方向の分解能 Γ_{xy}は球面型のおよそ 1/1.7 に、光軸(Z)方向の分解能 Γ_zは 1/5.3 程度にまで設計上は改善する。さらに分子の蛍光を捕集する有効立体角 Ω が 5.2 倍に向上した効果と相まって、式 (1)より分子の位置決定精度は XY 方向で見球面型の 1/3.9 に、Z 方向で 1/12 に改善すると見込める。一方、非球面鏡を導

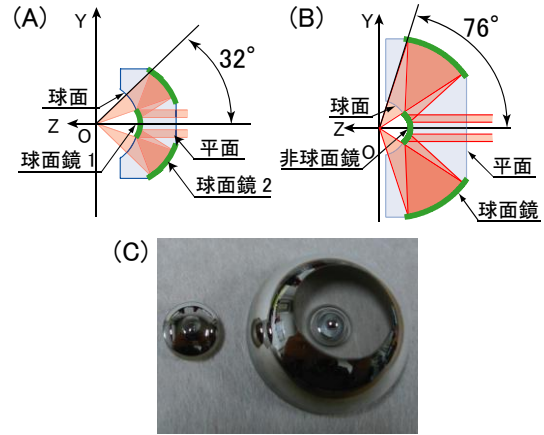


図 1. (A)球面型反射対物レンズ。焦点距離 2.00 mm、NA=0.53、外径 φ10 mm。(B)非球面型反射対物レンズ。焦点距離 1.79 mm、NA=0.97、外径 φ30 mm。(C)反射対物レンズの写真。左が球面型、右が非球面型。

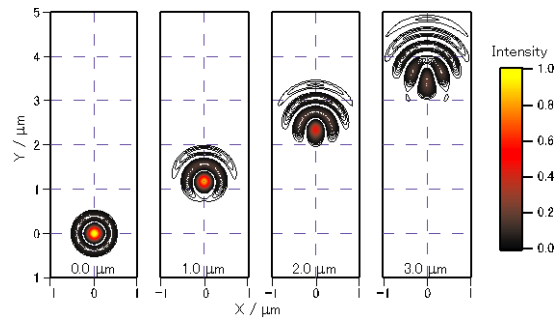


図 2. 非球面型反射対物レンズで平行光を集光したときにおける、焦平面上の強度分布の計算結果。左から順に、集光位置を焦点から 1 μm ずつずらした。

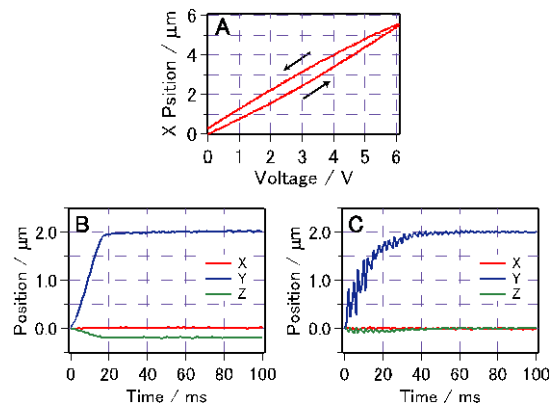


図 3. (A)ピエゾステージのヒステリシス特性。(B)オープンループ制御でステージを Y 方向に 2 μm 動かしたときの各軸の動き。(C)フィードバック制御をかけてステージを Y 方向に 2 μm 動かしたときの各軸の動き。

入したことでコマ収差が顕著になる。図 2 に集光像の計算結果を示す。原点からわずか $1 \mu\text{m}$ ずれただけで像質が著しく悪化し、従来のようにレーザー走査によって蛍光画像を取得することができない。このため、サンプルを低温槽中で 3 次元走査する機構を構築した。

サンプルを動かすために、極低温で動作可能な piezo 素子駆動のステージを導入した。図 3A に示すのが piezo 素子への印加電圧に対するステージ位置の変化である。piezo 素子の伸縮は印加電圧に対してヒステリシス特性がある。また、このステージは各軸が非独立でクロストークが大きい。例えば図 3B に示すように、ステージを Y 方向に動かすと、連動して Z 方向にも動く。これらの特性のため、このステージ単体で使用しても正確に変位を制御できない。正確なサンプル走査をおこなうため、ステージの位置をセンサーで測定し、フィードバックをかけるシステムを製作した。図 3C にフィードバックをかけて Y 方向にステージを動かしたときの各軸方向における位置の変化を示す。立ち上がりが遅くなったものの、 50 ms 以内に各軸とも目標座標に収束した。

【1 分子蛍光測定結果と評価】図 4 に蛍光顕微鏡のセットアップを示す。測定する試料と共に対物レンズ、試料ステージ、位置センサーを低温層の中に配置した。励起光に用いるレーザーをピンホールとレンズで平行光にし、ビームスプリッターで反射させて対物レンズによって基板上的蛍光分子に集光させた。一方、分子が放出した蛍光は対物レンズで集めてビームスプリッターを透過させ、マルチモードファイバーにカップルし、ディテクターでその光子数をカウントした。

図 4 の装置を用いて、 10 pM の Alexa Fluor 647 色素溶液または 270 pM の ATTO 647N 色素溶液を CaF_2 基板にスピコートしたサンプルについて、波長 635 nm 励起の 1 分子蛍光測定をした。測定は Ar ガスによって低温槽中の酸素をバージした状態で、室温でおこなった。図 5A, B にそれぞれ球面型と非球面型の反射対物レンズで取得した蛍光画像およびその強度断面を示す。この結果から得られた面内方向の分解能 Γ_{xy} は球面型で $0.57 \mu\text{m}$ 、非球面型で $0.32 \mu\text{m}$ だった。図 6 には焦点の光軸方向の広がり測定結果を示す。球面型では $4.5 \mu\text{m}$ だった面内方向の分解能 Γ_z は非球面型では $1.2 \mu\text{m}$ となった。表 1 に球面型と非球面型の分解能と立体角の測定値と計算値をまとめた。 Γ_{xy} 、 Γ_z とともに NA の向上に応じて計算値どおりに改善したことにより、非球面型反射対物レンズが正しく動作したことを確認した。この結果から式 1 によって非球面型反射対物レンズの分子の位置決定精度を見積もると、面内方向で 1 nm 、光軸方向で 3 nm となり、タンパク質の立体構造測定が可能な水準に到達した。

【参考文献】

- [1] I. Kii et al, *Org. Biomol. Chem.*, **8**(18), 4051-4055 (2010).
- [2] S. Ohno et al, *J. Biochem.*, **141**(3), 335-343 (2007).
- [3] M. Fujiwara et al, *J. Opt. Soc. Am. B*, **26**, 1395 (2009).
- [4] S. Fujiyoshi et al, *Phys. Rev. Lett.*, **100**, 168101 (2008).
- [5] S. Fujiyoshi et al, *Phys. Rev. Lett.*, **106**, 078101 (2011).
- [6] M. Maruo et al, submitted for publication.
- [7] N. Bobroff, *Rev. Sci. Instrum.*, **57**, 1152 (1986).

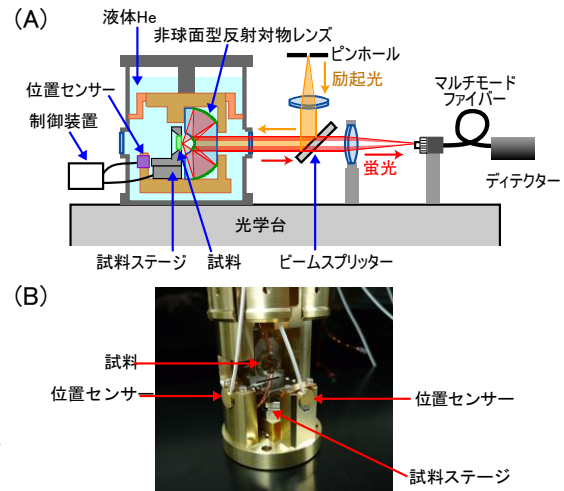


図 4. (A) 蛍光顕微鏡システム概略 (B) 低温槽への挿入部の写真

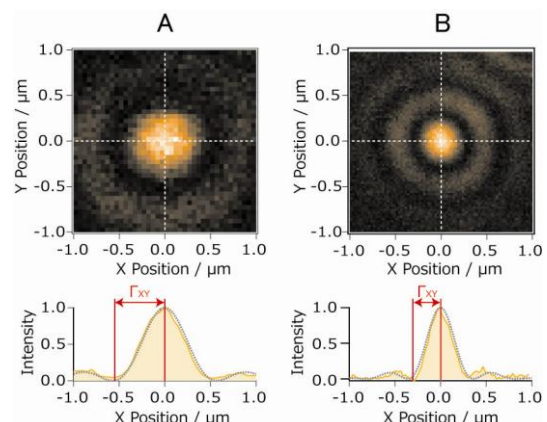


図 5. (A) 球面型反射対物レンズで測定した Alexa Fluor 647 色素 1 分子の蛍光画像。(B) 非球面型反射対物レンズで測定した ATTO 647N 色素 1 分子の蛍光画像。下段はそれぞれの強度断面。いずれも励起波長は 635 nm 。強度断面は橙色の実線が測定結果、黒色破線が計算値。面内方向の分解能 Γ_{xy} は球面型 $0.57 \mu\text{m}$ 、非球面型 $0.32 \mu\text{m}$ 。

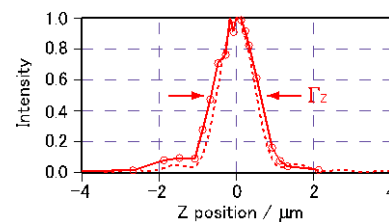


図 6. 1 分子の蛍光測定によって取得した非球面型反射対物レンズの焦点の光軸方向の広がり。実線が非球面型、破線は計算値。いずれも波長は 635 nm 。縦軸はエアリーディスク内の蛍光強度の総和である。光軸方向の分解能 Γ_z は $1.2 \mu\text{m}$ 。

表 1. 球面型、非球面型の両反射対物レンズの面内方向、光軸方向の空間分解能 Γ_{xy} 、 Γ_z 、および有効立体角 Ω 。

	NA	$\Gamma_{xy} / \mu\text{m}$	$\Gamma_z / \mu\text{m}$	$\Omega / \text{sterad.}$
非球面型	0.53	0.32 (0.34)	1.2 (1.0)	0.23π
球面型	0.97	0.598 ± 0.007 (0.590)	5.6 ± 0.5 (5.3)	1.19π

波長 635 nm における計算値と実測値。空間分解能は、面内方向についてはエアリーディスク半径、光軸方向については FWHM 値とした。