

### 3P088 温度数 K の色素分子の 3 次元イメージング技術の設計と実現

東工大 理工<sup>1</sup>・京大院 医<sup>2</sup>・東工大 生命理工<sup>3</sup>・東医歯大 生材研<sup>4</sup>

○虎谷 泰靖<sup>1</sup>・丸尾 美奈子<sup>1</sup>・稲川 博敬<sup>1</sup>・喜井 勲<sup>2</sup>・林 宣広<sup>3</sup>・細谷 孝充<sup>3</sup>・松下 道雄<sup>1</sup>・藤芳 暁<sup>1</sup>

Single-molecule fluorescence imaging of three-dimensional localization of dye molecules at 1.5 K.

<sup>1</sup>Graduate School of Science and Technology, Tokyo Tech · <sup>2</sup>Graduate School of Medicine, Kyoto University · <sup>3</sup>Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Tech · <sup>4</sup>Institute of Biomaterial and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

○Y. Toratani<sup>1</sup> · M. Maruo<sup>1</sup> · H. Inagawa<sup>1</sup> · I. Kii<sup>2</sup> · N. Hayashi<sup>3</sup> · T. Hosoya<sup>4</sup> · M. Matsushita<sup>1</sup> · S. Fujiyoshi<sup>1</sup>

生化学的手法の発達により、タンパク質選択的で、高効率な細胞内色素修飾法が提案されている[1]。これを用いれば、複合体形成をする複数のタンパク質に異なる色の色素を修飾したり、1つのタンパク質の観測したい部位に複数の色素を修飾したりできる。もし、光学顕微鏡によって修飾した色素同士の相対位置を数 nm の精度で 1 分子決定すれば、細胞内におけるタンパク質—タンパク質間の複合体の形成課程や、タンパク質自身の立体構造の多様性を 1 分子レベルで観測することが可能になるはずである。しかし、原理的には色素同士の位置を数 nm の精度で決定できるが、色素によるタンパク質の立体構造の 1 分子観察には誰も成功していない。光学原理から、限界性能を持つ対物レンズを用いても、得られる色素 1 分子の可視蛍光スポットは、図 1 のような、有限の幅 ( $\Gamma = 500$  nm) を持つ。タンパク質の大きさが数 nm であるので、可視光を使って、タンパク質の立体構造の 1 分子観測は不可能のように思えるが、スポットを綺麗に測定すれば、その重心  $\sigma$  は、 $\Gamma$  よりもはるかに高い精度で決定できる[2]。よって、それぞれの色素の重心を 1 分子ごとに決定することで、タンパク質の立体構造の 1 分子観測が可能になる。例えば、複合体形成する 2 つのタンパク質のそれぞれに、色の異なる色素を一つずつ修飾する。励起波長を選択することで片方ずつ光らせると、図 1 のように、2 つの輝点が見えるはずである。その相対位置を決定することで、タンパク質の複合体構造が 1 分子観察できるはずである。このような実験の提案は、1999 年に S. Weiss の総説[3]で提案されているが、実現していない。

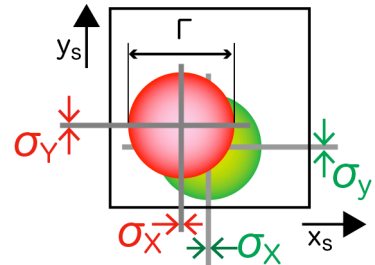


図 1. 色素 1 分子から得られる 2 次元蛍光イメージの模式図。Γ はスポットの直径、σ は重心の決定精度を表している。

実現が困難なのは、(1) タンパク質およびその複合体の立体構造を知るには、3 次元情報の取得が必要であることと (2) 3 次元方向に対して数 nm の精度を得るためには長時間の積算時間が必要なため、分子を固定する必要があることに由来する。我々はこれら 2 つの条件を満たす方法として、温度数 K における色素分子の 3 次元イメージング技術の開発をおこなっている。試料は、数 K に凍結することで固定する。また、顕微鏡において最も重要な部品である試料と対物レンズの機械的ドリフトを 1 nm 以下に抑えることに成功している[4]。さらに、数 K に凍結することで色素の光退色が抑えられるため、数時間にわたり 1 分子の測定を続けることが可能になる。

一方、これまで我々が開発した顕微鏡[5,6]では、焦平面方向  $x_s, y_s$  (図 2 参照) の情報しか得られない。そこで、図 2 のような数 K の 3 次元レーザー走査型の蛍光顕微鏡を新たに開発したので報告する。開発した顕微鏡は多色解析を可能にするために、反射光学系で構成されている。

図 2A の左および中央のように、原点に集光した光を 2 次元方向に走査するには、入射する角度  $\Delta\theta$  を変えれば良い。光学の原理から、対物レンズの焦点を  $f_{obj}$  とすると、光の焦点は、 $\Delta x_s = f_{obj} \Delta\theta_x$  ( $\Delta y_s = f_{obj} \Delta\theta_y$ ) の位置に移動する。この時、 $\theta$  が変わっても対物レンズの瞳位置 (2 個の赤丸で表す) をレーザービームが通るようにする必要がある。一方、 $z_s$  走査する場合には、図 2A 右のように、瞳位置におけるビームの直径を変えずに、レーザー光の広がり角を変化させる必要がある。これを実現するため、新しい顕微鏡 (図 2B) では、CM1~CM4 の 4 枚の球面鏡を用いた。4 枚の球面鏡以外は、これまでに開発した反射型共焦点顕微鏡の設計を踏襲している[5,6]。

CM1~CM3 は同じ焦点距離  $f_{CM}$  ( $= 125$  mm) のものを用いた。CM4 の焦点距離  $f_{CM4}$  は任意である。実際の実験では  $f_{CM4} = 2f_{CM}$  とした。対物レンズ-CM1 間の距離を  $2f_{CM}$ 、CM1-CM2 間を  $2f_{CM}$ 、CM2-CM3 間を  $f_{CM} + f_{obj}$ 、CM3-CM4 間を  $f_{CM} + f_{CM4}$  に配置する。この配置で CM4 と M1 を同時に  $z_{CM}$  方向へ動かすと、

$$\Delta z_s = \Delta z_{CM} \cdot (f_{obj} / f_{CM})^2$$

という関係で、焦点が  $\Delta z_s$  移動する。また、CM2 を  $x_{CM}$  または  $y_{CM}$  方向に移動すると、

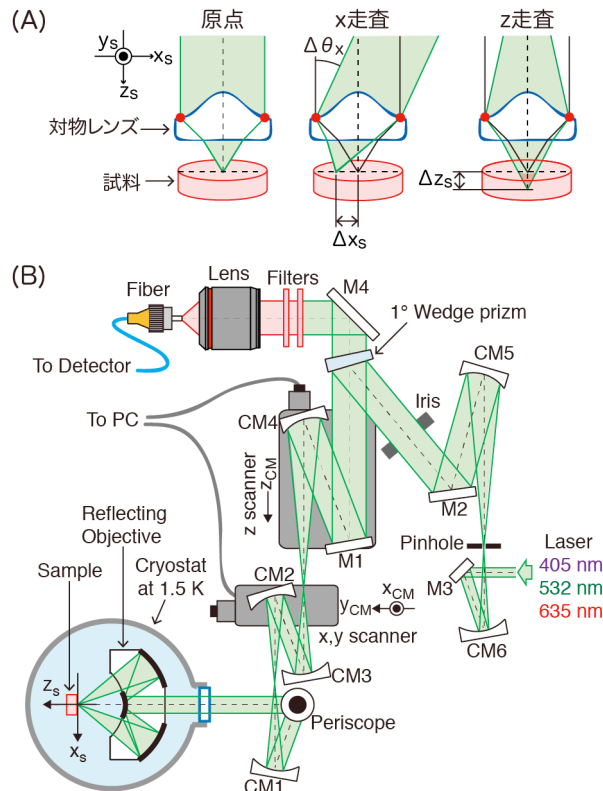


図 2. 数 K の 3 次元レーザー走査型の 1 分子蛍光イメージング。(A) 原理図。(B) 製作した装置。M は平面鏡、CM は凹面鏡。

$$\Delta x_s = \Delta x_{CM} \cdot (f_{obj} + \Delta z_s) / f_{obj}$$

$$\Delta y_s = \Delta y_{CM} \cdot (f_{obj} + \Delta z_s) / f_{obj}$$

と、焦点が $\Delta x_s$ または $\Delta y_s$ 移動する。この3次元レーザー走査機構を量子ドット Qdot705 の1分子イメージングにより実証した。

Qdot705 は、検査に用いた波長 405、532、635 nm の励起光を全て吸収し、波長 700 nm で発光する。図3は、1個のQdot705の3次元発光イメージである。また、同様のイメージを $z_s = -3 \mu\text{m}$  から  $3 \mu\text{m}$  まで  $1 \mu\text{m}$  間隔で測定し、フィティングにより第一暗環半径  $R_{1st}$  と  $z$  プロファイルの半値全幅  $\Gamma_z$  [7] を求めた。それぞれ、製作した光学顕微鏡の  $xy$  方向の分解能、 $z$  方向の分解能に対応する。これらの実験値を、光学設計ソフト Zemax により計算した反射対物レンズ単体の3次元の点像分布関数と比較した。その結果(表1)、最もズレが大きい波長 405 nm でも、光学シミュレーションからのズレが10%以内であり、ほぼ理想的な3次元走査が実現した。

励起光に 532 nm と 635 nm を用いた場合の位置決定精度の見積りをおこなった。Qdot705 はどちらの波長も吸収するために、装置の機械的揺れや、有限の信号ノイズ比から来る偶発誤差がなければ、2波長で観測されるスポットは一致するはずである。つまり、2つのスポットの位置ズレの分布が、位置決定精度に対応する。

3次元位置決定では、測定する軸以外は原点に止めて測定した。例えば、 $z_s$  に対して蛍光強度を測定する時には、 $x_s = y_s = 0 \mu\text{m}$  とした。図4Aに $z_s$ 走査の結果を示す。上段が 635 nm 励起、下段が 532 nm 励起の結果である。横軸は $z_s$ の位置であり、100回の測定を2次元で表している。各データごとにガウス関数でフィティング解析し、各回ごとの中心位置を求めた(図中の実線)。図4Bに、635 nm 励起の位置  $z_s(\text{Red})$  と 532 nm の  $z_s(\text{Green})$  の差、 $z_{RG} = z_s(\text{Red}) - z_s(\text{Green})$ 、をプロットする。これら100回の測定から、 $z_{RG}$  の平均値  $\langle z_{RG} \rangle$  を出した。このような測定を  $xyz$  軸に対しておこなった。 $xyz$  全ての軸に対しての測定にかかった時間は約100分であった。これを17個のQdot705に対して測定した。その結果を図4Cにしめす。図4Cの標準偏差が、相対位置の決定精度になる。得られた精度は、 $x_s$  方向で 2.8 nm、 $y_s$  方向で 3.1 nm、 $z_s$  方向で 18 nm であった。 $xy$  方向はタンパク質の大きさと同程度であり、目標とする精度を達成した。これに対して、 $z$  方向は 18 nm と目標を達成できなかった。位置決定精度は分解能の1次に比例する[2]。表1のように、 $z$  の分解能  $\Gamma_z$  は、 $xy$  の分解能  $R_{1st}$  よりも1桁悪い。そこで分解能を向上させ、3次元方向に対して数 nm の精度を得るため、 $NA = 0.97$  という理論限界(=1)に限りなく近い反射対物レンズの開発をおこなっている[8]。

1. I. Kii et al.; *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 4051 - 4055 (2010).
2. Bobroff; *Rev. Sci. Instrum.*, **57**, 1152 - 1157 (1986).
3. S. Weiss; *Science* **283**, 1676 (1999).
4. T. Hinohara, Y.I. Hamada, I. Nakamura, M. Matsushita, S. Fujiyoshi; *Chem. Phys.* **419**, 246 (2013).
5. S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, M. Matsushita; *Phys. Rev. Lett.* **100**, 168101 (2008).
6. S. Fujiyoshi, M. Hirano, M. Matsushita, M. Iseki, M. Watanabe; *Phys. Rev. Lett.* **106**, 078101 (2011).
7. 原点を中心とした半径  $R_{1st}$  の円の中に入る光強度を  $z_s$  に対してプロットし、その半値全幅を  $\Gamma_z$  とした。
8. 稲川 博敬, 松下 道雄, 藤芳 暁; 分子科学討論会 2013, 3P087

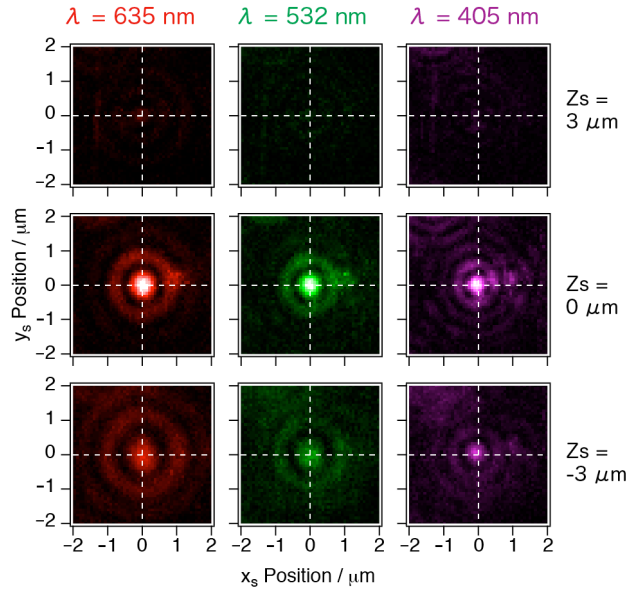


図3. 温度 1.5 K の Qdot705 の3次元発光イメージ。励起波長は、左から 635 nm、532 nm、405 nm である。 $z$  方向の上から  $3 \mu\text{m}$ 、 $0 \mu\text{m}$ 、 $-3 \mu\text{m}$  である。

表1.  $R_{1st}$  および  $\Gamma_z$  の実験値と計算値。

$\lambda / \text{nm}$	$R_{1st} / \mu\text{m}$		$\Gamma_z / \mu\text{m}$	
	実験値	計算値	実験値	計算値
635 nm	$0.598 \pm 0.007 (\sigma)$	0.590	$5.6 \pm 0.5 (\sigma)$	5.3
532 nm	$0.518 \pm 0.006 (\sigma)$	0.494	$4.3 \pm 0.4 (\sigma)$	4.5
405 nm	$0.411 \pm 0.007 (\sigma)$	0.376	$4.1 \pm 0.4 (\sigma)$	3.5

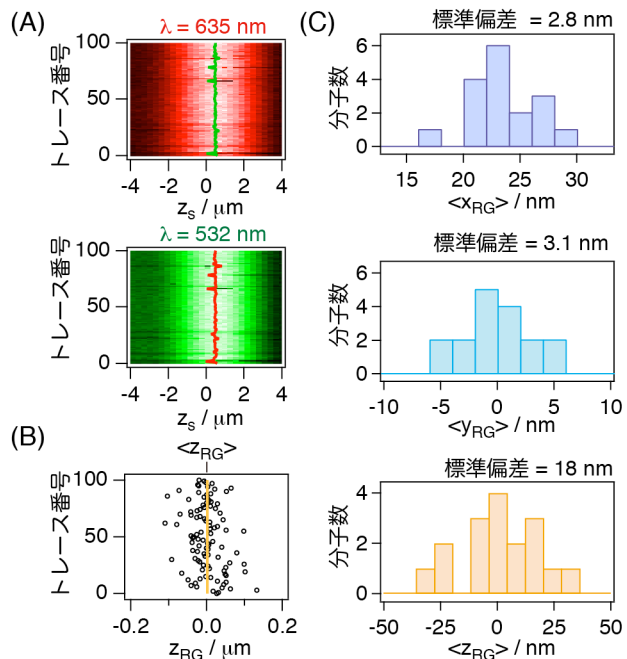


図4. 3次元位置決定精度の見積り。(A)  $z_s$  方向に対する2次元トレース。励起波長は 635 nm (上段) と 532 nm (下段)。(B) A の2波長の位置の差。その平均値  $\langle z_{RG} \rangle$  を橙色の実線で示す。(C) 17個のQdot705から得られた  $\langle x_{RG} \rangle$ 、 $\langle y_{RG} \rangle$ 、 $\langle z_{RG} \rangle$  の分布。