

3P089 温度1.5 Kのタンパク質1分子イメージング装置の機械的安定性評価と向上

東工大物理 ○若尾 佳佑・濱田 裕紀・日野原 拓也・松下 道雄・藤芳 暁

Mechanical stabilization of a microscopic system of the single protein fluorescence imaging at 1.5 K
(Department of Physics, Tokyo Institute of Technology)

○Keisuke Wakao, Yuki Hamada, Takuya Hinohara, Michio Matsushita, Satoru Fujiyoshi

【序】 近年、生化学の進歩により、タンパク質の任意の場所に活性を奪うことなく蛍光色素を付加できるようになった。[1]数 nm の精度で色素の位置を決定できれば、タンパク質の構造を知ることができる。このためには、図1のような共焦点顕微鏡による解析は、有効な手段の一つである。ピンホール1によって、レーザーは波面が整形されるため、対物レンズで集光されたXY平面の極めて狭い範囲だけの色素を励起できる。対物レンズの焦点からZ方向にずれて存在する色素の蛍光は、接眼レンズで絞り切れずピンホール2を通過できない。結果、三次元方向に対して高い空間分解能で試料中の蛍光像を選択できる。さらに、得られた蛍光像の重心から位置を求めると、その精度を数 nm まで上げられると報告されている[2]。我々は、共焦点顕微鏡を中心に一分子レベルの位置決定精度を持つ光学系を構築している。

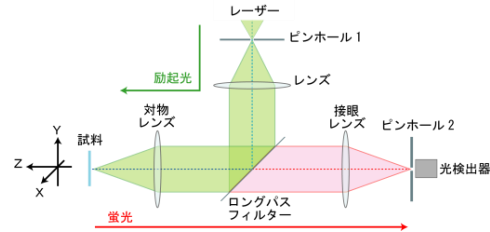


図1 共焦点顕微鏡。光軸をZ軸、それに対し垂直な面をXY平面とする。

数 nm の精度を得るには、これと同程度に顕微鏡を安定させる必要がある。2009年、顕微鏡の中で最も安定させなければならない試料 - 対物レンズペアを、一体型ホルダーに設置してクライオスタットと呼ばれるステンレス製の超流動ヘリウム槽（円筒形でおよそ底面の直径 20 cm、高さ 120 cm）に沈めることで、相対誤差を標準偏差で 1 nm 未満に抑えることに成功した[3]。しかし、未だ最大振幅にすると 3 nm 程で相対位置が揺らいでいる。この揺れは数分の周期を持っており、室温の変化と同じスケールである。クライオスタット内部の温度は超流動ヘリウムによって外部から隔離されるので、主に外側の構造変化が揺れに寄与していると思われる。そこで、今回クライオスタットの振動解析を行い、揺れの要因を解析したので報告する。

【クライオスタットの安定性評価方法】 インサートの振動を測定するために、図3(a)の光学系を組み立てた。インサートに試料 - 対物レンズペアの試料位置に 30 μm ピンホールを取り付けてクライオスタット内に挿入し、He-Ne レーザー(633 nm)を照射した。拡散されたピンホール像を対物レンズ($f=200$ mm)で集め、接眼レンズ($f=200$ mm)で焦平面にある CMOS カメラ (ARTCAM 130MI-BW)のセンサー上に結像した。温度変化や風の外乱によって測定精度が下がらないように、結像系をアルミ製の箱で囲った。対物レンズの焦点距離を f 、接眼レンズの焦点距離を f' とすると、CMOS 上での像の動きはインサートの揺れに対して f/f' 倍となる。 $f=f'$ のようにレンズを選択したので、インサートのピンホールの動きを等倍で見る系である。得られる像は図3(b)のようになる。これを撮影しガウスフィットで重心位置を求めた。図3(c)のように、同じ過程を繰り返して重心位置の変化を記録し、クライオスタットの安定性を評価した。

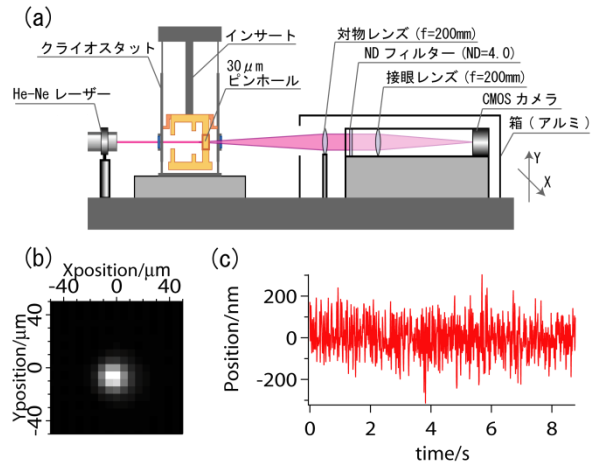


図2 (a)インサートの振動を測定するための光学系 X は水平方向、Y は鉛直方向である。(b)CMOS カメラ上のピンホール像(c)ピンホール像の重心位置の時間変化

【クライオスタットの振動解析】 クライオスタットの環境を変えながら、安定性評価を行った。毎秒 114 枚(114 FPS) で計 1000 枚撮影した。これをフーリエ変換し、周波数特性を調べた。白色ノイズが支配的となるが、同じ測定を 100 回繰り返し、得られたデータの平均をとることで統計的に緩和させた。以上の操作を行い、周波数領域で比較した。結果を図 5 に示す。(a)~(d)は、測定環境の違いを示す。我々は、(b)の環境で一分子分光を行っている。(a)では、(b)で作動していた除震台の空気ばねの電源を止めた。(c)では、(b)でクライオスタットの真空引きに使用していたポンプの電源を止め、(d)ではそのために用いていたフレキシブルチューブを全て取り外した。

X 成分には 6 Hz 以上に固有のピークがある。(a)と(b)の結果から、除震台によって 6, 10 Hz の振動は床から伝播している。(b)と(c)の比較から、25 Hz の振動は主に真空ポンプから伝播している。(c)と(d)の比較から、14, 16, 17, 21, 23 Hz の振動がポンプの電源を止めた後もフレキシブルチューブから伝播している。壁に穴をあけてフレキシブルチューブを通してることから、同じ壁に取り付けられたエアフィルターの振動が伝播していると考えられる。(d)の結果から、以上の 3 つの振動を断つことでピークが消え、振動は標準偏差で $0.12 \mu\text{m}$ 程と安定する。これらは、ソフトベローや除震台によってクライオスタットから構造的に分離できることから十分に対応できる。Y 成分に立つピークは、条件を変えてもほぼ変わらない。これらは、CMOS センサーに由来するノイズであり、振動源によるものでないことを確認した。この時の振動の標準偏差 $0.13 \mu\text{m}$ で安定である。

一方、5 Hz 未満で緩やかに存在する成分は、振動経路を断つても変わらなかったため、温度変化によるクライオスタットのドリフトであると考えられる。温度計をクライオスタットの外側に貼り付け、ピンホール像の揺れと温度を同時に測定した。変化の遅い成分を比較するために、撮影速度を 15 FPS で 10 秒間撮影したデータの平均をとって速い振動成分を落とし、測定時間を 100 分に伸ばした。結果を図 6 に示す。スポットの揺れは気温の変化に対して X 方向に $4.4 \mu\text{m}/\text{K}$ 程で、Y 方向に $5.6 \mu\text{m}/\text{K}$ 程で追従した。許容される 500 nm のドリフトに相当する温度変化はおおよそ 100 mK 程度だが、実験室の気温は 2 K 以上変動し、空調による温度制御では不十分である。

【アルミ製の箱による温度安定化の評価】 以上の議論より、100 mK 程の温度変化が光学系の精度に作用することがわかった。そこで、図 3 の装置でも用いたアルミ製の箱の効果を定量的に評価した。温度計を 2 つ使用し、実験室のアルミ製の箱の内部と外部で一日の温度を測定した。結果を図 7 に示す。青色の線が箱外部の温度、赤色の線が内部の温度を表す。一日の間に箱外部の温度は 1 K 程揺れるのに対し、箱内部のものは 550 mK しか揺れなかった。計測開始から 5 時間分のデータを拡大したところ、箱によって主に 15 分周期より短い振動成分が削ぎ落とされ、温度安定化の効果があることがわかった。しかし、依然として 500 mK 程揺れるので、制御器による温度安定化が必要である。

参考文献

- [1] I. Kii et al, Org. Biomol. Chem. Chem., 8(18), 4051-4055 (2010)
- [2] A. Bloß et al, J. Microscopy., 205, 76-85 (2002)
- [3] Hinohara Takuya et al, Chemical Physics., 419, 246-249 (2013)

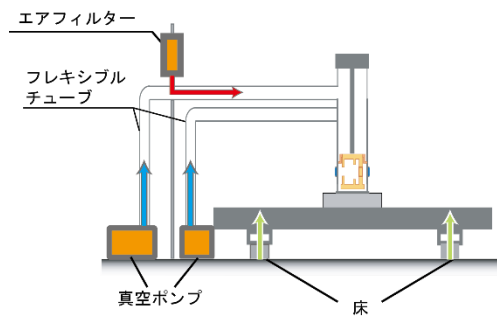
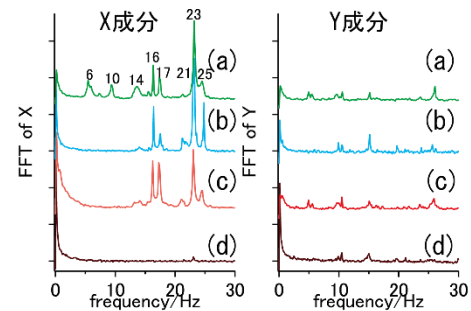


図 3 (上段)ピンホール像の揺れのフーリエ変換。(b)環境で一分子分光を行っている。(a):(b)で作動していた除震台の空気ばねの電源を止めた(c):(b)でクライオスタットの真空引きに使用したポンプの電源を止めた(d):(c)からフレキシブルチューブを全て取り外した。(下段)測定結果から振動の伝達経路をまとめた図

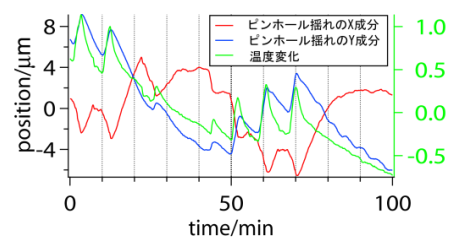


図 4 ピンホール像の揺れ(赤&青)と実験室の温度変化(緑)。平均値をオフセットとして除いた。

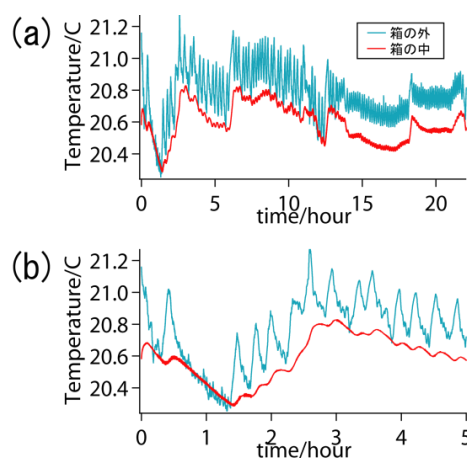


図 5 (a) 一日間のアルミの箱の外部(青)と内部(赤)の温度変化。(b)その測定の開始後 5 時間目までのデータを拡大したもの。