

### 3P072 極低温共焦点蛍光顕微鏡の開発による細胞の多色イメージング

東工大 物性物理<sup>1</sup>・京大院 医<sup>2</sup>・京大院 生命科学<sup>3</sup>

○本橋 和也<sup>1</sup>・若尾 圭祐<sup>1</sup>・稲川 博敬<sup>1</sup>・古林 琢<sup>1</sup>・

喜井 勲<sup>2</sup>・定家 真人<sup>3</sup>・石川 冬木<sup>3</sup>・松下 道雄<sup>1</sup>・藤芳 暁<sup>1</sup>

Development of cryogenic confocal fluorescence microscope for multi color imaging of a cell

<sup>1</sup>Department of Physics, Tokyo Institute of Technology<sup>2</sup>, Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine,

Kyoto University · <sup>3</sup>Department of Gene Mechanisms, Graduate School of Biostudies, Kyoto University

○K.Motohashi<sup>1</sup>, K.Wakao<sup>1</sup>, H.Inagawa<sup>1</sup>, T.Furubayashi<sup>1</sup>, I.Kii<sup>2</sup>, M.Sadaie<sup>3</sup>, F.Ishikawa<sup>3</sup>, M.Matsushita<sup>1</sup>, S.Fujiyoshi<sup>1</sup>

【序】生化学的手法の発達により、生きた細胞中にあるたんぱく質を蛍光色素で特異的に染色することが可能になっている[1,2]。複数の色の蛍光色素を用いれば、複数のターゲットたんぱく質の多色イメージングが可能になり、細胞内構造体の立体構造を知るなどの応用が期待できる。特に共焦点顕微鏡は、対物レンズ焦点からの光のみを検出するため、3次元構造の情報を得ることができ、最も信号-ノイズ比の高い配置であるため広く使われている。図1に共焦点顕微鏡概念図を示す。

励起光の波面を励起光側ピンホールを通して整えた後、対物レンズによって試料に照射する。試料上における励起光の強度分布  $I_{ex}$  は対物レンズの点像分布関数に一致する。試料から出た蛍光はビームスプリッターを透過し、検出側ピンホールを抜けた分が1次元検出器によって検出される。取得できる画像は試料の蛍光強度分布  $I_f$  を用いて  $I_f \times I_{ex}$  となる。一方で、1枚の画像を得るためには構成する各点で光検出を行うために総測定時間が長くなるという欠点がある。このため生きた細胞中の流動的な構造や、生命現象の過程で変化していくような構造を観察することが難しい。そこで我々は細胞を温度 1.7 K に凍結し、生きた細胞のある一瞬の状態を観察することを目指している。今回低温に凍結した細胞を観察可能な共焦点蛍光顕微鏡を開発し、ヘリウム温度 1.7 K 下の細胞の観察に成功したので報告する。

【実験】製作した顕微鏡を図2に示す。最大の特徴は低温使用可能な NA=0.99 の反射対物レンズ[3]を使用することで、様々な波長の励起光を色収差なく回折限界程度にまで集光できることである。すでに報告した顕微鏡[3]との違いは検出側ピンホールを入れることで厳密な共焦点配置になっているところである。

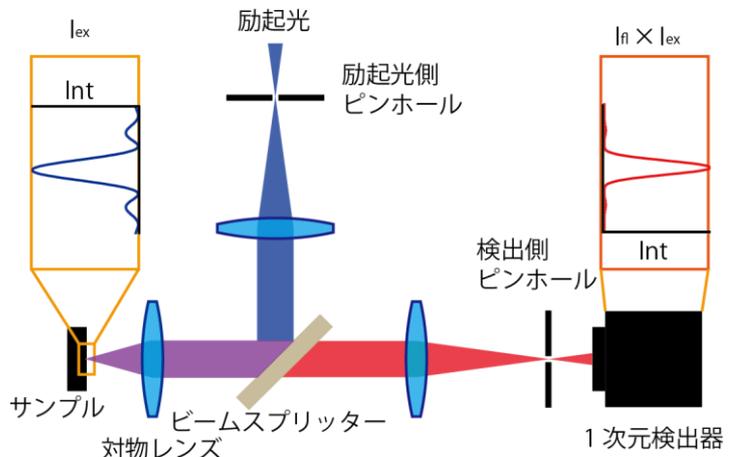


図1: 共焦点顕微鏡概念図

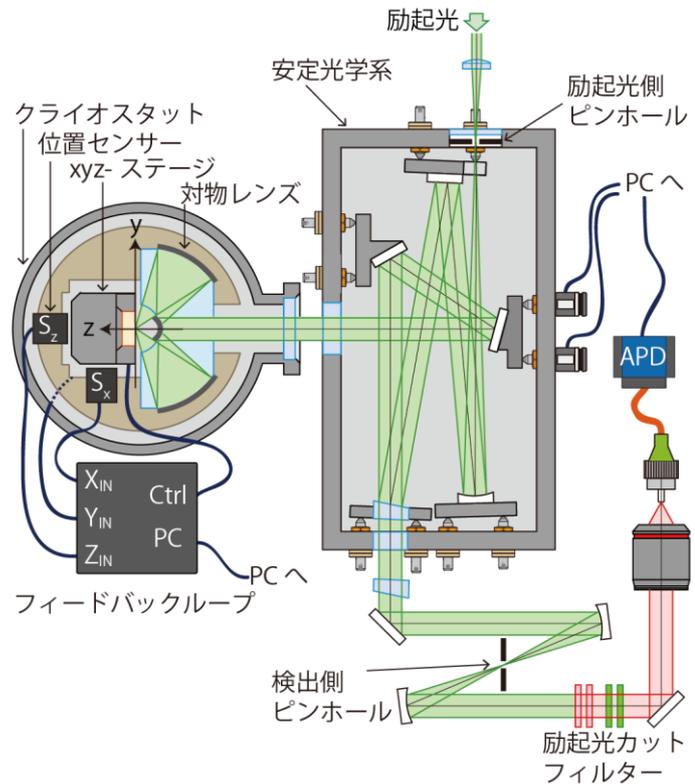


図2: 製作した低温共焦点蛍光顕微鏡

【結果】1.7 KにおけるHeLa細胞の蛍光イメージングを行った。細胞核はHoechst33342、核内のテロメアはAlexaFluor660で染色した。テロメアは核内の染色体末端にあるTTAGGGのリピートである。このテロメアは6種類のたんぱく質と複合体を作ることが知られており、そのうちの一つであるTRF1を免疫染色した。波長375 nmの励起光で核を、637 nmの励起光でTRF1をイメージングした結果を図3に示す。(b)にある白線は(a)から読み取れる核の境界を記入したものである。核内にあるテロメアが一個の輝点として検出されることが確認できた。テロメアを細胞中にある点光源と見立てることで顕微鏡の特性を調べた。561 nmおよび637 nmで光励起したTRF1の三次元蛍光イメージを図4に示す。図4をガウスフィッティングすることで $1/e^2$ 幅を求めた結果と対物レンズの点像分布関数から予測される $1/e^2$ 幅の見積もり値を表1にまとめる。見積もりに用いた点像分布関数はスピコート膜中のQdot705を $\lambda = 532, 635$  nm励起で測定した $\Gamma(532), \Gamma(635)$ を用いた[3]。 $\Gamma$ が波長に比例すると仮定し、 $I_{ex}(\lambda = 561 \text{ nm})$ は $\Gamma(532)$ をもとに、 $I_{ex}(637), I_{fl}(700)$ は $\Gamma(635)$ をもとに計算し、それぞれの励起波長に対して $I_{ex}$ と $I_{fl}$ をかけ見積もりとした。核中でもスピコート膜から求めた値と1割以内の誤差で一致している。HeLa細胞のような厚みのある( $\sim 10 \mu\text{m}$ )、屈折率が異なる物質を含む環境では集光の際に波面が乱れ、像質が悪化する場合があることが知られている[4]。しかしHeLa細胞のような小さい細胞では、波面乱れが像質に及ぼす影響は小さいことがわかった。

【参考文献】

- [1] Neal K. Devaraj et al.; *Bio Chem*, **19**, 2297 (2008)
- [2] Georgyi V. Los et al.; *ACS Chemical Bio*, **3**, 373 (2008)
- [3] Inagawa et al.; *Scientific Reports impress*
- [4] Na Ji et al.; *Nature Methods*, **27**, 1 (2009)

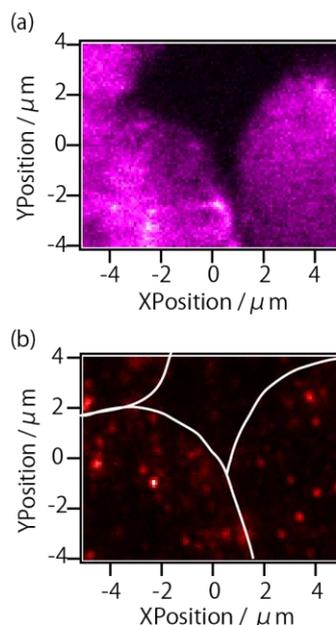


図3:1.7 KにおけるHeLa細胞の蛍光イメージング。励起波長は375 nm(a)及び637 nm(b)

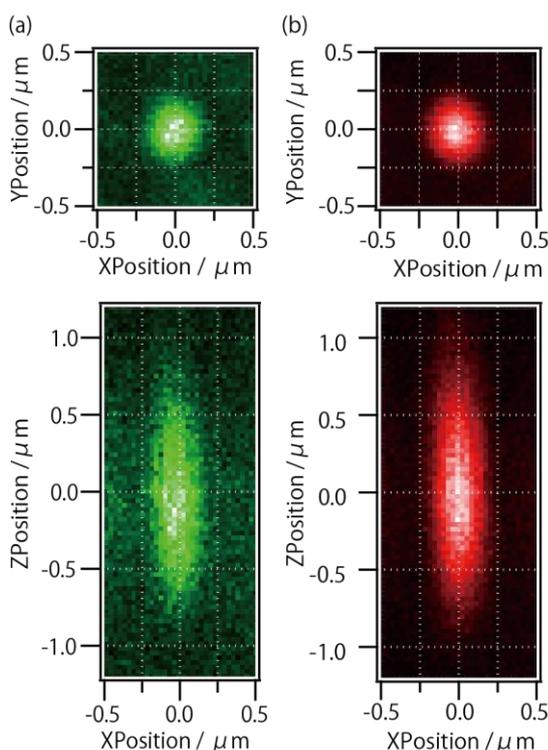


図4:1.7 Kにおける一つのテロメアの蛍光イメージ。励起波長は561 nm(a)及び637 nm(b)

表1:1.7Kにおける顕微鏡の光分解能と見積もり値

$\lambda_{ex}/\text{nm}$	$\Gamma_{xy}/\mu\text{m}$		$\Gamma_z/\mu\text{m}$	
	細胞中	薄膜中	細胞中	薄膜中
561	0.182	0.165	0.712	0.707
637	0.202	0.177	0.849	0.760