

2P099

近赤外波長可変レーザーを用いたクライオ 1 分子蛍光顕微鏡の作製 (東工大 物理) ○田邊 大明・資延 啓・藤芳 暁・松下 道雄

Single-molecule cryo-fluorescence microscope with near-infrared tunable laser light.

(Department of Physics, Tokyo Institute of Technology) ○Hiroaki Tabe, Kei Sukenobe,
Satoru Fujiyoshi & Michio Matsushita

【序】 蛍光顕微鏡は化学・生物学・医学などの広い分野において重要な手法である。例えば、その応用として、細胞中の狙ったタンパク質に蛍光色素や蛍光タンパク質を特異的に標識し、その蛍光を検出することで細胞の内部構造を可視化することができる。しかし、光の回折現象により、蛍光顕微鏡の分解能は分子レベルに達していない。生命現象のような複雑系を正確に理解するには分子の分布やその相互作用を分子レベルで観察することが重要である。このような観察に有望なのがクライオ蛍光顕微鏡であると考えている。この方法では既に 7 nm の分解能 (半値全幅) が達成されている[1]。この分解能は室温での実験と比べて 1 桁高い。この実験では非極性分子 (n-tetradecane) 結晶中の色素 (DBATT) を用いて観察を行った。極低温において、DBATT 分子の吸収スペクトル幅は 25-60 MHz と、不均一幅~600 GHz に比べて 4 桁細くなる。この系に対して、十分に線幅の細いレーザー光で蛍光励起スペクトルを測定すると、個々の DBATT 分子がスペクトルラインとして観測される。このようなスペクトル分解によって、個々の分子を見分け、超解像画像を得ている。しかし、細胞中では極性環境が大きく異なり、DBATT 分子を細胞観察にそのまま用いても、同じようにスペクトル分解できない。そのため、我々はスペクトル分解によるクライオ超解像イメージングに適した蛍光色素を探すために近赤外波長可変レーザーを用いたクライオ蛍光顕微鏡を開発したので報告する。

【実験】 波長可変レーザー 作製した波長可変レーザーの光学系を図 1 に示す。光源はチタンサファイアレーザー (波長 800 nm、パルス幅 100 fs) を用いた。1/2 波長板と偏光子で強度を調整した後、レンズ L1 (f=9 mm) で 500 mW のレーザー光をフォトニック結晶ファイバーにカップルした。出力したスーパーコンテニューム光をレンズ L2 (f=9 mm) でコリメートした後、2 枚のレンズ (L3: f=-100 mm, L4: f=500 mm) によってビーム径を 5 倍拡大し、プリズムで分光した。この時のビーム直径 (1/e²幅) は 17 mm であり、このビーム直径が最終的な出力光のスペクトル幅を決める。プリズムから出た光のビーム径を 2 枚のレンズ (L5: f=400 mm, L6: f=-50 mm) で小さくし、レンズ L7 (f=9 mm) でシングルモードファイバーにカップルした。L6 と L7 の間にある 2 枚の平面ミラー M3, M4 はカップル効率を調整するためである。レンズ L6, L7 と平面ミラー M3, M4 とシングルモードファイバーは電動ステージの上に乗っていて、紙面上下方向に移動させることで任意の波長の光をシングルモードファイバーにカップルすることができる。図 2(a) に波長可変レーザーのスペクトルを示す。中心波長は 664.1 nm、スペクトル幅 (半値全幅: FWHM) は 0.27 nm であった。また、図 2(b) に各波長におけるスペクトルの FWHM と光強度を示す。図のように 500~700 nm において、FWHM が 0.3 nm 以下であり、光強

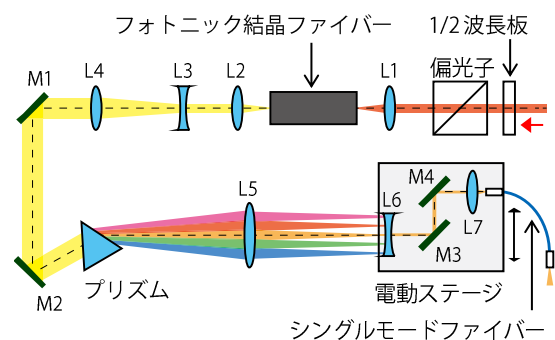


図 1: 作製した波長可変レーザー

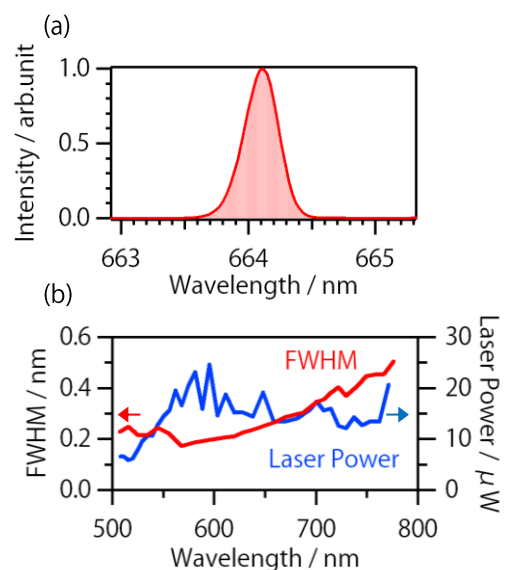


図 2: 作製した波長可変レーザーのスペクトル(a)及び波長幅 (FWHM) と光強度(b)

度が 10~20 μW であった。

クライオ蛍光顕微鏡 作製したファイバー入力型のクライオ共焦点蛍光顕微鏡の光学系を図3に示す。シングルモードファイバーから出力した波長可変光をビームスプリッターで反射させ、球面鏡CM1 ($f=500\text{ mm}$) でピンホールを通過させ、球面鏡CM2 ($f=500\text{ mm}$) でコリメートした。2枚の球面鏡CM3,CM4 ($f=250\text{ mm}$) はレーザー走査機構のために設置しており、電動ステージの上に乗ったCM3を移動させることでサンプル上で光の焦点を2次元に空間走査できる[2]。サンプルからの蛍光は励起光の逆経路を通り、ビームスプリッターを通過してアバランシェ・フォトダイオード (APD) で検出した。図の中央にあるピンホール (直径: $300\text{ }\mu\text{m}$) は光源のピンホール兼、検出のピンホールであり、有無は電動ステージによって切り替え可能である。作製したクライオ顕微鏡は球面鏡を用いた反射型であるため色差差がゼロであり、ファイバー入力型であるため様々なレーザー光を使用できる。反射型の対物レンズには焦点距離が 2 mm 、開口数が 0.6 のものを用いた。

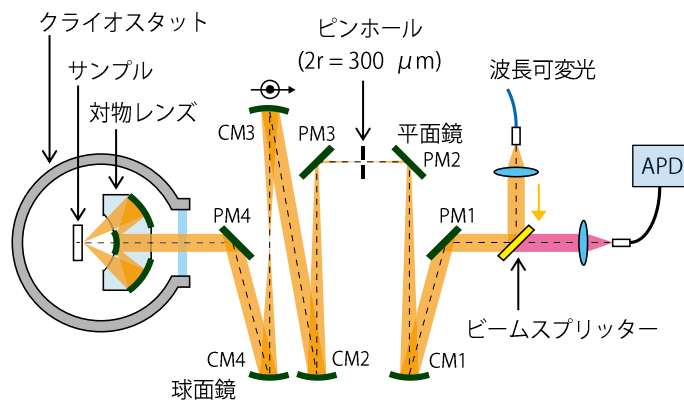


図3：作製したファイバー入力型クライオ共焦点蛍光顕微鏡

【結果】作製したクライオ蛍光顕微鏡の性能を確認するため、Alexa Fluor 750 (以下、Alexa750) の室温 (296 K) における1分子蛍光イメージを行った。試料には濃度 90 pM とした Alexa750 緩衝溶液のスピンコート膜を用いた。膜厚を均一にするためにポリビニルアルコール1%を混ぜた。励起光には半導体レーザー (OBIS685、波長 685 nm) を用いた。図4(a)に $30\text{ }\mu\text{m} \times 30\text{ }\mu\text{m}$ の範囲で測定したピンホールありの1分子蛍光イメージを示す。個々の Alexa750 が個々の輝点として、1分子ずつ約50個観測された。また、ピンホールの有無による1分子蛍光イメージの違いを図4(b),(c)に示す。2つの図を比較すると、ピンホールを用いることで、反射対物レンズに特有の強いエアリーリングが小さくなり、中心のエアリーディスク幅も小さくなっている。今後、波長可変レーザーと顕微鏡を組み合わせ、超流動液体ヘリウム温度で単一分子状態での蛍光色素の発光励起スペクトルを測定し、クライオ超解像に適したの色素の検討を行う。

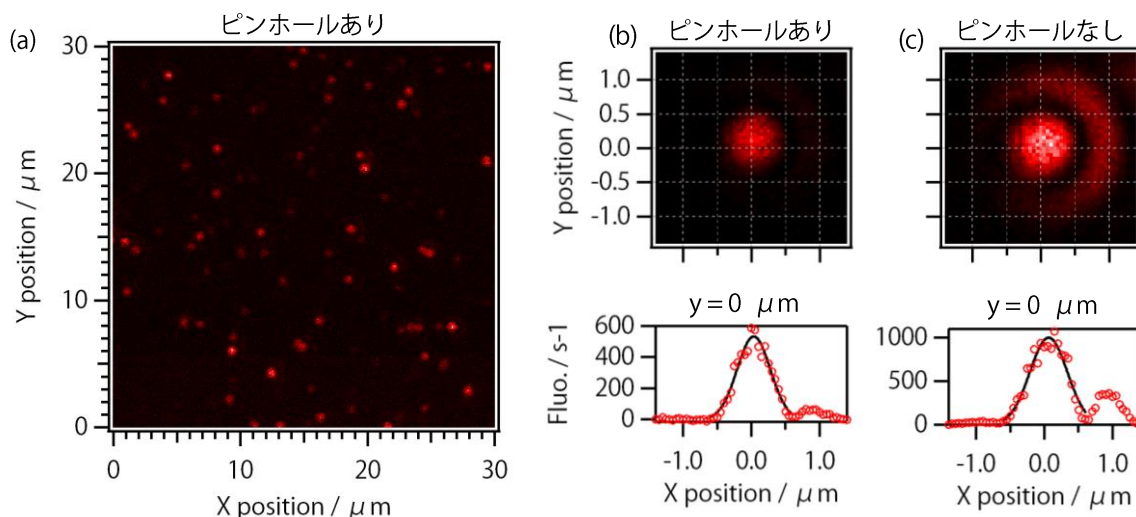


図4：室温 (296 K) における Alexa750 のピンホールありの蛍光イメージ(a)とピンホールあり(b)及びピンホールなし(c)の1分子の蛍光イメージと $y=0\text{ }\mu\text{m}$ における断面強度分布。

【参考文献】

[1]A.BLOEB et al. ; *Journal of Microscopy*, **205**, 76-85 (2002)
 [2]S.Fujiyoshi et al. ; *Phys. Rev. Lett.*, **106**, 078101 (2011)