

3P095

精度 1 nm で三次元位置決定ができるクライオ蛍光顕微鏡の光学シミュレーション

(東工大・物理) ○古林 琢、松下 道雄、藤芳 暁

Optical simulation of cryogenic fluorescence microscope

for three-dimensional localization of single dyes with a nanometer precision

(Dept. Physics, Tokyo Tech.) ○Taku Furubayashi, Michio Matsushita, Satoru Fujiyoshi

【序】生命現象を理解するためには細胞内部にある構造体を分子解像度で三次元イメージングすることが重要となる。しかし、様々な顕微鏡が開発されているが、このようなイメージングは不可能である。例えば蛍光顕微鏡を考えると、1分子の微弱な蛍光から分子解像度を得るには長時間の観測が必要だが、室温では分子が動いてしまうため、分子解像度は実現していない。そこで我々は試料を急速凍結することで分子の運動を止め、高精度に位置決定することを目指してクライオ蛍光顕微鏡を開発している[1]。本講演では二次元検出器を使用して1個の分子の三次元位置を分子解像度で測定できることを、光学シミュレーションによって明らかにしたので報告する。

【XY方向位置決定】焦平面(XY平面)方向の位置決定法について示す。図1(a)が計算に用いた顕微鏡の光学系である。図のように焦平面をXY平面、光軸方向をZ軸として定義した。ターゲット分子からの蛍光を反射対物レンズ($f=2.04$ mm)で集め、凹面鏡($f=1,000$ mm)を用いて CCD カメラへ集光した。対物レンズから凹面鏡の距離はそれぞれの焦点距離の和とした($1,002$ mm)。図1(b)は光子数が2,500個のときに得られる蛍光画像のシミュレーションである。これは、光学計算ソフト Zemax によって CCD 上における点像分布関数(PSF)を計算し、光子数 N に応じたポアソンノイズをかけたものである。計算波長は 705 nm とした。この画像に対しガウス関数でフィッティングし、ターゲット分子の XY 位置を決定した。このとき N に対する位置精度 σ_{xy} を図1(c)に表す(図中の丸)。この計算では1点あたり1,000回の計算し σ_{xy} を算出した。図から N に対して σ_{xy} は $\sigma_{xy}=133 \text{ nm}/\sqrt{N}$ の式で表すことができ(実線)、この比例定数(133 nm)は報告されている理論式とほぼ一致する[2]。このとき、精度 1 nm を達成する光子数はおよそ $20,000$ counts となる。この顕微鏡で想定される第一暗環半径内の光子数は $5,000$ counts/sec である。つまり X, Y 方向を 1 nm で決定するのにかかる時間は 4 秒である。これは現実的な時間である。

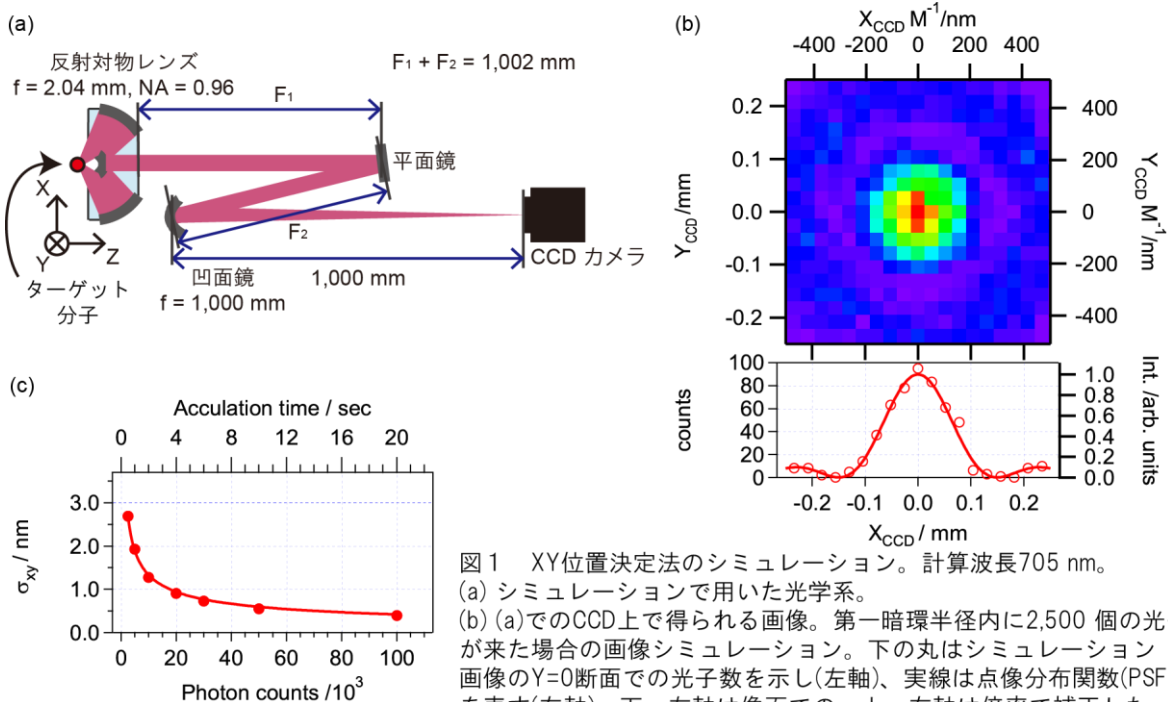


図1 XY位置決定法のシミュレーション。計算波長705 nm。

(a) シミュレーションで用いた光学系。

(b) (a)でのCCD上で得られる画像。第一暗環半径内に2,500個の光子が来た場合の画像シミュレーション。下の丸はシミュレーション画像のY=0断面での光子数を示し(左軸)、実線は点像分布関数(PSF)を表す(右軸)。下・左軸は像面での、上・右軸は倍率で補正したスケールである。

(c) 光子数に対するXY方向の位置精度。上軸はフィッティング領域に1秒あたり5,000個の光子が来たときにかかる測定時間を示す。

【Z方向位置決定法】光軸方向(Z軸)の位置決定法について示す。二次元画像からZ方向の位置を決定するために、ビーム径から求める方法を用いた[3]。しかし、焦点付近ではPSFのビーム径の変化が非常に小さく、Z方向の位置の変化に対して鈍感である(ビームウエストと呼ばれる領域)。そこで焦点距離 $f=5,000$ mm のレンズを凹面鏡の 367 mm($=F_3$) 手前に追加し、蛍光を CCD カメラの手前で集光させ、ぼかした画像を得た(図 2(a))。図 1(a)の系で得られる画像が図 2(b)、図 2(a)の系で得られる画像が図 2(c)である。図 2(c)を見ると同心円状に複数の干渉縞が見えている。これには主に波長に関する情報を含んでいるので、Z方向の位置決定には妨げとなる。干渉縞の空間周波数は高いので、空間的にローパスフィルタの役目を果たすように隣り合ういくつかのピクセルをまとめると図 2(d)の画像ようになる。図 2(d)の画像に対しガウス関数でフィッティングし、スポット幅 s を得た。ターゲット分子の位置を Z 方向に -5 nm から $+5$ nm まで動かしたときにおける s の変化量は、図 2(e)のように 1 次で比例していた。よって、幅 s から位置 z が求められることが分かった。N に対しての Z 方向の位置精度 σ_z について、PSF を ZEMAX により計算した。その結果を図 2(f)の丸で示す。このとき N に対しての σ_z は $\sigma_z=707$ nm / \sqrt{N} となり(実線)、比例係数がおおよそ 5 倍大きくなった。これは主に図 2(d)の PSF に対しフィッティングを行ったガウス関数の幅がおおよそ 5 倍大きくなったことが要因である。このとき、精度 1 nm を達成するために必要な、フィッティング領域における光子数はおおよそ 500,000 counts である。この顕微鏡で想定される全光子数は 12,500 counts/sec であるため、必要な観測時間は 40 秒となる。これも現実的な時間である。

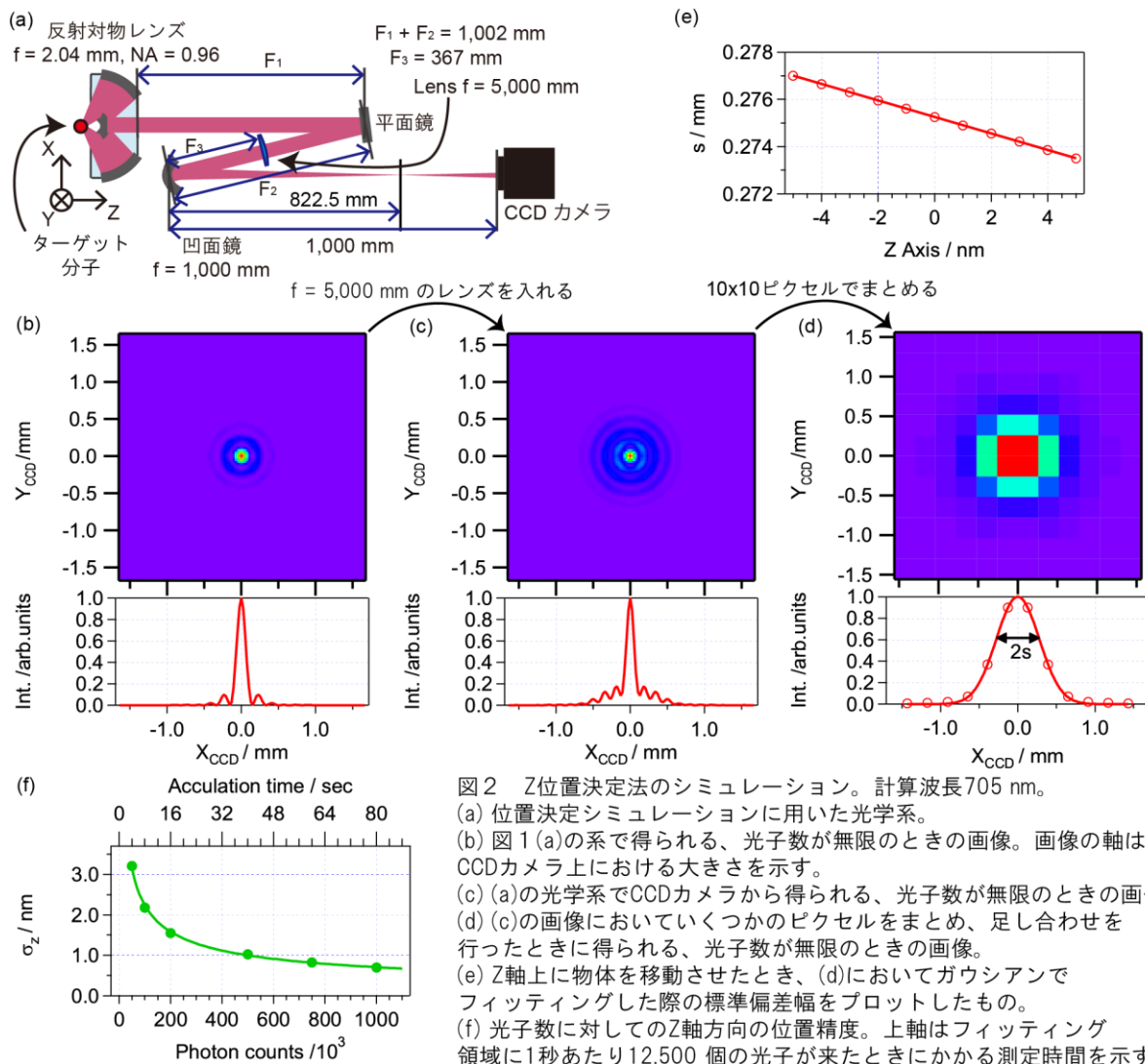


図2 Z位置決定法のシミュレーション。計算波長705 nm。
 (a) 位置決定シミュレーションに用いた光学系。
 (b) 図 1 (a)の系で得られる、光子数が無限のときの画像。画像の軸は CCD カメラ上における大きさを示す。
 (c) (a)の光学系で CCD カメラから得られる、光子数が無限のときの画像。
 (d) (c)の画像においていくつかのピクセルをまとめ、足し合わせを行ったときに得られる、光子数が無限のときの画像。
 (e) Z軸上に物体を移動させたとき、(d)においてガウシアンでフィッティングした際の標準偏差幅をプロットしたもの。
 (f) 光子数に対しての Z 軸方向の位置精度。上軸はフィッティング領域に 1 秒あたり 12,500 個の光子が来たときにかかる測定時間を示す。

【参考文献】

[1] H. Inagawa et al; Sci. Rep. 5, 12833 (2015)
 [2] R. E. Thompson et al; Biophys. J. 82, 2775 (2002)
 [3] H. Pin. Kao and A. S. Verkman; Biophys. J. 67, 1291 (1994)