

クライオ1分子蛍光イメージングによる高精度三次元位置決定

(東工大・物理¹,京大院 医²,理研CLST³)本橋 和也¹・古林 琢¹・若尾 佳祐¹・松下 道雄¹・石川 冬木²・喜井 勲³・〇藤芳 暁¹“Precise Three-Dimensional Localization of Individual Molecules
by Cryogenic Fluorescence Microscope”¹Department of Physics, Tokyo Institute of Technology, ²Department of Gene Mechanism, Kyoto University, ³RIKEN, Center for Life Science Technologies (CLST).K. Motohashi¹, T. Furubayashi¹, K. Wakao¹, M. Matsushita¹, F. Ishikawa², I. Kii³ & S. Fujiyoshi¹

生命現象では、多種多様な生体分子が相互に作用しながら、三次元ネットワークをつくり生理機能を発現・調整していると考えられている。このような複雑系を理解するためには、その現場である細胞内部を分子レベルで知ることが不可欠である。しかし、既存法ではこのような観察は不可能である。例えば、細胞が観察できる最も高解像度なクライオ電子線トモグラフィー(cryo-ET)でも、その解像度は4-5 nmと分子レベルに達していない[1]。その結果として分子の帰属もできない。そこで我々は分子解像度の三次元イメージングを目指して、クライオ1分子蛍光顕微鏡の独自開発を続けている。蛍光イメージングにはcryo-ETにない3つの利点がある。第一に1分子の感度が実現している点である[2]。解像度を突き詰めていくと最終的には1分子からの信号を観察しなければならないため、1分子の感度は必須条件である。第二に、蛍光イメージングでは分子の帰属が可能である点である。たとえば、Green Fluorescent Protein (GFP)をターゲットのタンパク質に融合させれば、生細胞中でターゲット分子のみを選択的に可視化できる。つまり解像度と無関係に分子の帰属が可能である。第三に、細胞のような厚さ(約十ミクロン)のある試料の観察が可能である点である。これらの利点がある反面、欠点は解像度の低さである。現在、蛍光顕微鏡の解像度は、固定化した細胞に対して超解像顕微法を用いれば約20 nmに改善するが[3]それでもcryo-ETにははるかに及ばない。生細胞ではさらに悪化することが報告されている[4]。解像度を悪くしているのは(1)分子の動きと(2)顕微鏡の不安定性である。そこで我々は(1)について、cryo-ETと同様、試料を急速凍結することで分子の動きを完全に止めて観察することを考えている。(2)について、対物レンズや低温槽、顕微光学系の部品を、機械的安定性が得られるように、独自に開発することでナノメートルの安定性を実現した[5]。これらの結果、ごく最近、我々は標準偏差(σ) \sim 1 nmで3次元位置を1分子ごとに決定できるクライオ蛍光顕微鏡を開発した。そこで、本講演ではこの顕微鏡の詳細を報告する。

目標とする分子解像度について説明する。図1Aは原点(0 nm, 0 nm)にある蛍光分子を $\sigma = 1$ nmの精度で50回測定を繰り返した場合に、観察される分子の位置のシミュレーション結果である(ピンクの十字)。一般的に、画像の解像度は 2σ ないし半値全幅(2.4σ)で定義され、視覚的にも半径 $2\sigma = 2$ nmの円(白線)内にほとんどの点が集まっているのが分かる。この結果とGFPの立体構造[PDB code: 1EMA](図1b)を比較すると、半径 2σ の円はGFPの大きさとほぼ等しく、 σ が1 nmあれば分子を見分けることができることが分かる。そこで、ここでは $\sigma \leq 1$ nmを分子解像度と定義する。

実験 観察に用いた顕微鏡はすでに報告したクライオ蛍光顕微鏡[2]をベースにしている。報告した顕微鏡との大きな違いは光検出器が一次元のもの(アバランシェフォトダイオード)から二次元(CCD)になったことである。

図2に、開発したクライオ蛍光顕微鏡の光学系をしめす。対物レンズの焦平面方向をxy、深さ方向をzと定義する。図2aに、xy方向の位置決めをするための光学系をしめす。波長637 nmの励起光をビームスプリッター(DM)によって反射させ、クライオスタット中に設置した対物レンズによって、試料へ集光する。試料は、静電容量センサーによって安定化させたピエゾスキャナーに載っている。ターゲットからの蛍光(波長 \sim 700 nm)を同じ対物レンズで集める。ターゲット1分子からの蛍光はDMを通過し、凹面鏡によってCCD面内に結像させる。この像を正規分布でフィッ

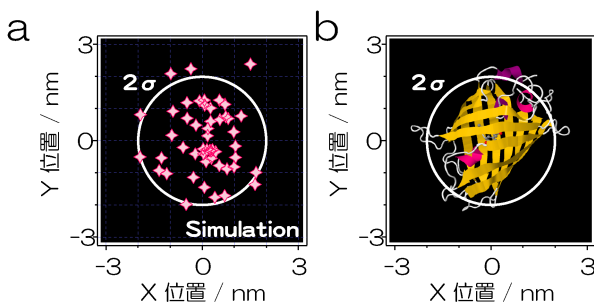


図1. 分子解像度とは。原点にある分子を標準偏差 $\sigma = 1$ nmの精度で50回測定を繰り返した時に観察される分子の位置のシミュレーション(a).GFPの立体構造(b).

ングすることで、ターゲットの位置を1分子決定できる[6]。深さ z の位置を決める場合には、図 2b の位置に凸面単レンズ ($f = 5,000 \text{ mm}$) を挿入すると、このレンズと CM との合成焦点は CCD の手前に来る。このように、CCD 上ではぼやけた像とすると、深さ z 方向の位置情報をスポットの幅として取得することができる[7]。この系での光学シミュレーションなどの結果は本討論会ポスター発表 (3P095) で議論する [8]。

顕微鏡を評価するテスト試料には量子ドット (Qdot705, Thermo Fisher) 緩衝溶液のスピコート膜を用いた。Qdot を1分子観察すると、一般的な色素よりも2桁以上強く蛍光する。そこで、色素での実験を想定して蛍光量が $\sim 5,000 \text{ s}^{-1}$ になるように励起光強度を調整した。測定温度は 1.7 K で、試料と対物レンズは液体ヘリウム中に浸して測定した。

結果 図3に、3次元方向に対するQdotの1分子位置決定の実験結果をしめす。試料の温度が 1.7 K であるため、Qdotは基板に完全に固定されている。顕微鏡の性能を評価するため、Qdotの位置を低温ステージによって $5 \sim 10 \text{ nm}$ ずつ動かし、蛍光イメージから得られた分子の位置を観察した。図中の丸 (○) が蛍光イメージから求めた色素の位置であり、黒線 (—) がセンサーによって求めたステージの位置である。図3を見ると、ステージの位置の移動量だけ、蛍光イメージで得られた分子の位置も動いていることが分かる。それぞれの図の下に、蛍光イメージから求めた位置からセンサーから求めた位置を引き算した結果を丸 (○) で示す。これらのデータの標準偏差 σ を求めると、 1.1 nm (z 軸)、 1.0 nm (x 軸)、 1.1 nm (y 軸) となった。これが顕微鏡の精度になる。この測定の1点あたりの積算時間は 192 s (z 方向)、 4 s (xy 方向) であり、同じ精度を得るのに、 z 方向と xy 方向では 50 倍も積算時間 t が違う。これは、主に、この顕微鏡で得られる蛍光イメージが、回折現象によって z 方向に伸びた楕円形をしているからである。以上より、開発したクライオ蛍光顕微鏡を用いれば、 xyz すべての軸に対して、分子解像度で1分子イメージングできることが確認できた。

参考文献

- [1] S. Nickell, C. Kofler, A.P. Leis & W. Baumeister, *Nature Review* **7**, 225 (2008).
- [2] W.E. Moerner & L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **62**, 2535 (1989).
- [3] E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davison, J.L. Schwartz, H.F. Hess, *Science*, **313**, 1642, (2006).
- [4] H. Shroff, C.G. Galbraith, J.A. Galbraith & E. Betzig, *Nat. Meth.* **5**, 417 (2008).
- [5] H. Inagawa, Y. Toratani, K. Motohashi, I. Nakamura, M. Matsushita & S. Fujiyoshi, *Sci. Rep.* **5**, 12833, (2015).
- [6] R.E. Thompson, D.R. Larson & W.W. Webb, *Biophys. J.* **82**, 2775 (2002).
- [7] H.P. Kao & A.S. Verkman, *Biophys. J.* **67**, 1291 (1994).
- [8] ○古林琢、松下道雄、藤芳暁、分子科学討論会 2016, 3P095.

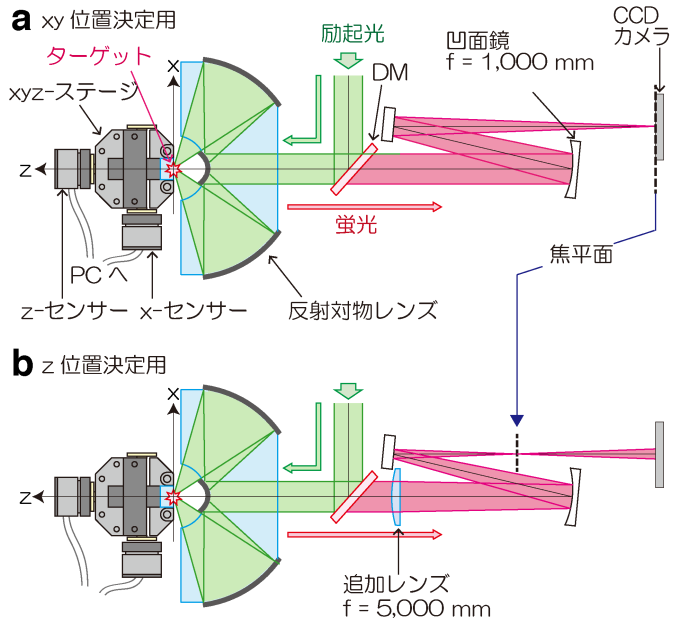


図 2. xy 位置決定および z 位置決定のための光学系。

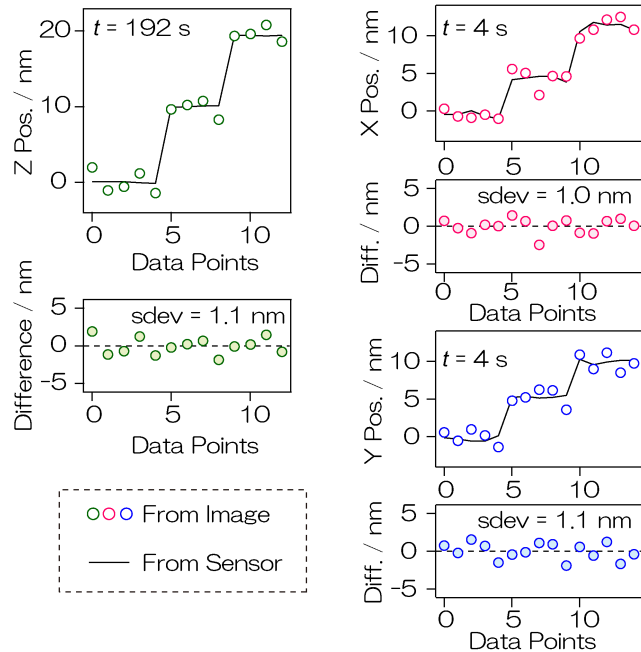


図 3. 温度 1.7 K における Qdot の xyz 位置の一分子観察。丸が蛍光イメージから求めた色素の位置、黒線が静電容量センサーから求めた低温ステージの位置、それぞれのデータの下に、イメージから得られた位置からセンサーから得られた位置を引き算したものをしめす。