

クライオ超解像蛍光顕微鏡の制作

東工大 物理

資延 啓, 田邊大明, 石井啓暉, 松田 剛, 古林 琢, 松下道雄, ○藤芳 暁

Superresolution fluorescence microscope of individual molecules in aqueous matrix at cryogenic temperatures

Kei Sukenobe, Hiroaki Tabe, Hiroki Ishii, Tsuyoshi Matsuda, Taku Furubayashi,
Michio Matsushita, ○Satoru Fujiyoshi

Department of Physics, Tokyo Institute of Technology, Japan.

【Abstract】 Fluorescence microscopy is unique in its ability to individually image biomolecules in whole cells. However, the resolution of the fluorescence microscopy is one-order-of-magnitude worse than a molecular level. In the presentation, we show a construction of a superresolution fluorescence microscope for single-molecule imaging in an aqueous matrix under cryogenic conditions. To realize the high resolution imaging, we have constructed the cryogenic fluorescence microscope with a numerical aperture of 0.99 and an imaging stability of 0.05 nm at 1.8 K. As the result, the three dimensional position of an individual fluorescent molecule (ATTO647N) at 1.8 K was determined with a standard error of less than 1 nm. In addition to the construction of the high precision microscope, we are testing several fluorescent molecules that have been used as a label of biomolecules toward superresolution cellular imaging of biomolecules under cryogenic conditions.

【序】 蛍光顕微鏡は細胞内部を1分子の感度で三次元イメージングできる唯一の方法である。蛍光測定における励起と検出は可視光で行うことができるため、切片にすることなく、細胞全体の三次元空間を画像化できる[1]。また、可視域では量子収率が1に近い光検出器があるため、1分子の感度が実現している。生細胞中での蛍光標識技術は進歩しており、ねらった分子種をその機能を損なわないように標識することが可能である。このように、蛍光顕微鏡には生体試料の測定のための多くの優位点を持つ。しかし、欠点は低い解像度である。現在、最も解像度の高い蛍光顕微鏡である超解像顕微鏡を用いても、固定化細胞における三次元解像度が約30~50 nmである[2]。さらに生細胞では1桁解像度が低下する[3]。生体分子の大きさ(1~10 nm)と比べると分かるように、蛍光顕微鏡では分子レベルのイメージングが不可能であると考えられている。

超解像顕微鏡の解像度の限界を決めているのは分子の動きである。そこで、我々は試料を凍結し、分子の動きを完全に止めて観察するクライオ蛍光顕微鏡を開発している。極低温では分子の動きが止まるだけでなく、色素分子の光退色を抑えることができるので、任意の解像度が達成できるはずである。しかし、実際には顕微鏡の性能不足のために、このような測定は実現していなかった。そこで、我々は極限の光学性能と、0.05 nmという高いイメージ安定性を持ったクライオ蛍光顕微鏡を独自開発した。この顕微鏡を用いて、ごく最近、色素1分子の三次元位置を<1 nmの精度で決定することに成功した[4]。これは、目標である分子レベルに達している。講演では、次ページに示すクライオ顕微鏡の制作と、超解像イメージングに必要な分子の探索についても紹介する。

【結果】 図1に制作したクライオ蛍光顕微鏡のヘリウム槽をしめす。冷媒である超流動ヘリウムは槽全体に充填した。対物レンズもヘリウム槽内に配置し、一体成形の試料ホルダーに固定した。試料の位置は、微調整用の xyz-Scanner と粗調整用の Positioners によって動かすことができる。また、その位置を xyz 3 方向に配置した静電容量センサーによって観察、制御することができるようになっている。但し、本講演では静的な安定性についてのみ議論する。

我々が以前制作した試料ホルダー[文献4, 図 S1d 参照]は、真鍮、チタン、セラミック、テフロンと熱膨張係数が違う材料で出来ていたため、ヘリウム槽内温度変化による機械的ドリフトが顕著であった。そこで、新しい試料ホルダーでは、熱膨張係数がほとんど同じであるチタン、セラミックだけを使うことにした。図2はヘリウム槽内の温度とステージの位置の関係である。温度は図1に示したセルノックスセンサーを用いて測定した。温度が 0.2 K 変わると、ステージの位置が約 25 nm 移動した。温度計とヒーターを使ってアクティブに制御すると、ヘリウム槽の温度変化を標準偏差 0.2 mK (図 3a) に抑えることができるので、温度変化に由来するドリフトは標準偏差 0.03 nm と極めて極めて小さくなる。次に、温度を制御した状態でステージの位置を測定した。その結果を図3にしめす。図 3a はヘリウム槽内の温度であり、データ間隔 6 秒、標準偏差 0.11 mK であった。この条件で、測定したステージの位置が図 3b であり、各軸の標準偏差 (データ間隔 3 秒間) は 0.28 nm (x), 0.42 nm (y), 0.33 nm (z) であり、目標の分子イメージングに十分な安定性であった。

【参考文献】

- [1] Huang, B., Jones, S. A., Brandenburg, B. & Zhuang, X. W. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nat. Methods* **5**, 1047-1052, (2008).
- [2] Jia, S., Vaughan, J. C. & Zhuang, X. W. Isotropic three-dimensional super-resolution imaging with a self-bending point spread function. *Nat. Photonics* **8**, 302-306, (2014).
- [3] Shroff, H., Galbraith, C. G., Galbraith, J. A. & Betzig, E. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat. Methods* **5**, 417-423, (2008).
- [4] Furubayashi, T., Motohashi, K., Wakao, K., Matsuda, T., Kii, I., Hosoya, T., Hayashi, N., Sadaie, M., Ishikawa, F., Matsushita, M. & Fujiyoshi, S. Three-dimensional localization of an individual fluorescent molecule with angstrom precision. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 8990 - 8994, (2017).

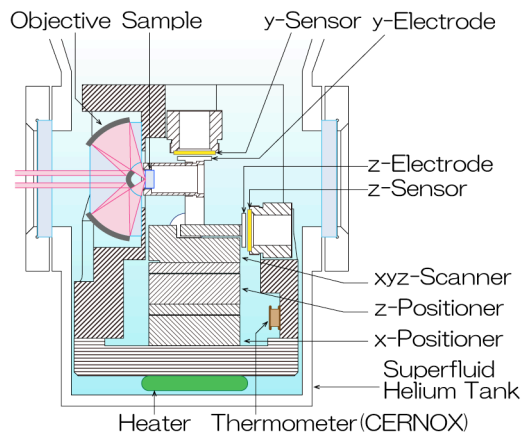


Figure 1. Design of superfluid helium tank.

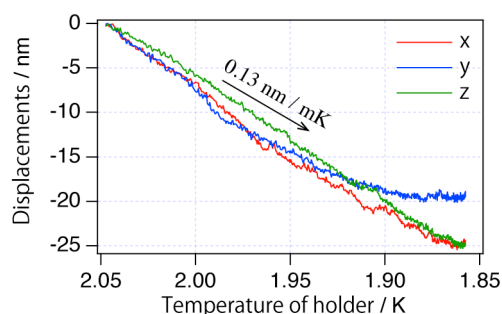


Figure 2. Mechanical drift of the cryo-stage caused by cooling of the holder.

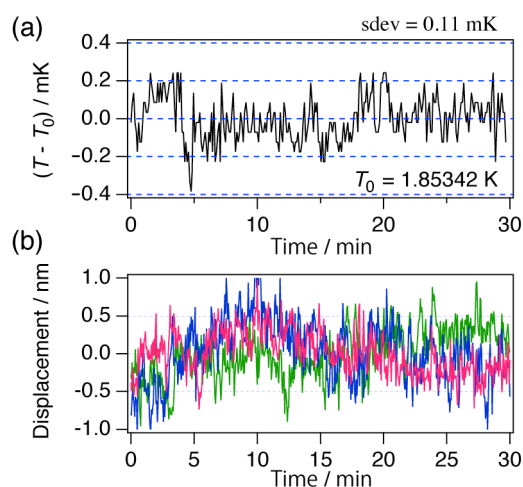


Figure 3. Mechanical stability at a constant temperature. (a) Temperature of superfluid helium tank and (b) 3D position of cryo-stage: x-axis (red), y-axis (blue) and z-axis (green). The standard deviation of σ_x , σ_y and σ_z are 0.28 nm, 0.42 nm and 0.33 nm, respectively.