

クライオ蛍光顕微鏡による二本鎖DNAの 1分子光イメージング

東京工業大学 物理学系
○古林琢, 石田啓太, 松下道雄, 藤芳暁

Optical imaging of individual double stranded DNA using cryogenic fluorescence microscope

○Taku Furubayashi, Keita Ishida, Michio Matsushita, Satoru Fujiyoshi
Department of Physics, Tokyo Institute of Technology, Japan

【Abstract】 Molecular level imaging is important for on understanding of biological functions. However, such imaging has been challenging. Fluorescence microscopy has a potential for realizing the molecular level imaging. This microscopy is unique in its ability to visualize individual molecule in whole cells. However, the resolution is deteriorated to several tens of nanometers by experimental barriers. We have solved all the barriers by developing a cryogenic reflecting microscope. Recently, we visualized 5'- and 3'- ends of double stranded DNA by using spectrally distinct two dyes that emitted near-infrared fluorescence at 1.8 K.

【序】 生命現象の理解には、生体分子を分子レベルでイメージングすることが重要である。しかし、未だにそのような観測は行われていない。我々はこのような観測に向けて、細胞内の観察にユニークな優位点を持つ蛍光顕微鏡に注目している。蛍光顕微鏡の弱点は、分子の動きや蛍光色素の退色により、解像度が 20 – 50 nm に制限されている点である。そこで我々は極低温に試料を凍結させて固定化することで、これらの問題を解決した。その結果、1分子の蛍光色素の3次元位置をオングストローム精度で決定した[1]。最近、二本鎖 DNA の両末端の光イメージングに成功したので報告する。

【実験】 開発したクライオ蛍光顕微鏡の光学系を Fig.1 に示す。試料基板を反射型対物レンズと共にホルダーに固定し、クライオスタット内の超流動液体ヘリウム中で 1.8 K に凍結する。このような一体型の配置によって、機械的安定性をオングストロームレベルに向上させている。

試料には Fig.2A のような 30 塩基対の二本鎖 DNA の 5'-末端、3'-末端にそれぞれ近赤外蛍光色素 Alexa Fluor 750 (Ax750) と ATTO655 (AT655) を修飾したものを用いた。色素の吸収、蛍光スペクトルを Fig.2B に示した。この2種の色素を見分けるために2種類の励起光と光学フィルターをそれぞれ

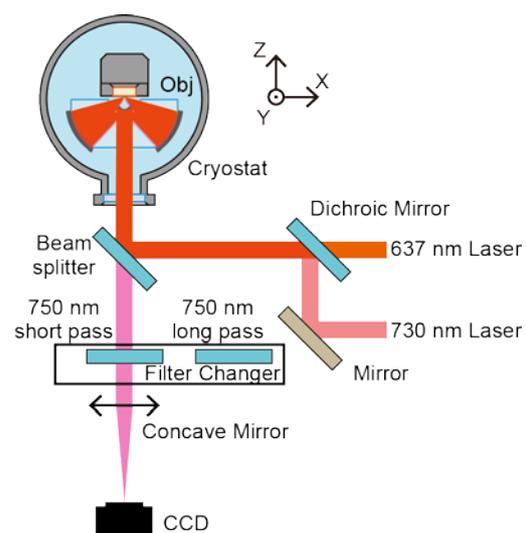


Fig. 1. Optical setup of the cryogenic reflecting fluorescence microscope. BS is beam splitter. 750 nm short pass filter and 750 nm long pass filter were selectable with the filter changer.

用意した。Ax750 は 730 nm レーザーで励起し、その蛍光を 750 nm ロングパスフィルターを通して、AT655 は 637 nm レーザーで励起し、その蛍光を 750 nm ショートパスフィルターを通して CCD カメラで検出する。これによって、回折限界内の 2 つの色素をスペクトル上で選択した。この際、サンプルを光軸方向にスキャンし、画像を取得することで各蛍光色素の 3 次元 PSF を取得した。取得した画像を解析することで、その色素間の相対位置を求め、イメージングした。

【結果】 Fig.3A は共通の DNA に結合した 2 つの色素の蛍光による PSF である。色素によって PSF が光軸方向(z)に対し異なる方向に傾いていることが分かる。これは Fig.4 のように蛍光色素の遷移ダイポールが z 方向へ θ_{zx} 傾いているとき、PSF も ϕ_{zx} 傾く現象によるものと考えている。21 個の DNA に染色された色素を測定した結果、この 2 つの色素による PSF の傾きの差の標準偏差は 0.06 rad であった。共焦点系で測定した場合の z 軸の位置の不確定さは ± 500 nm であったため、x, y 軸の位置決定に ± 30 nm の系統誤差を与えていた。

ダイポール輻射に由来する系統誤差を抑えるため、3次元 PSF を取得し、z 軸の位置を標準偏差 25 nm の精度で求めた。このとき、x, y 軸の系統誤差は 1.5 nm となり、分子レベル光イメージングに十分な精度となった。このような系で 21 個の二本鎖 DNA の 5'-末端と 3'-末端の光イメージングを行った。

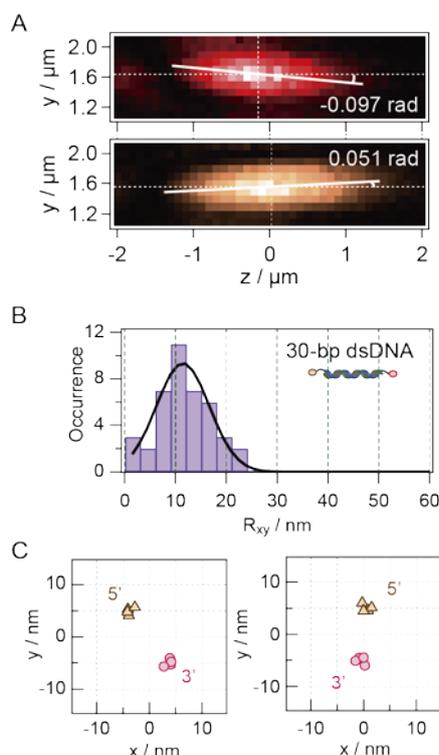


Fig. 3. (A) Experimental results for tilted PSF. (B) Histogram of the distance between the 5'- and 3'- ends. (C) Optical image of dual-labeled dsDNA at 1.8 K

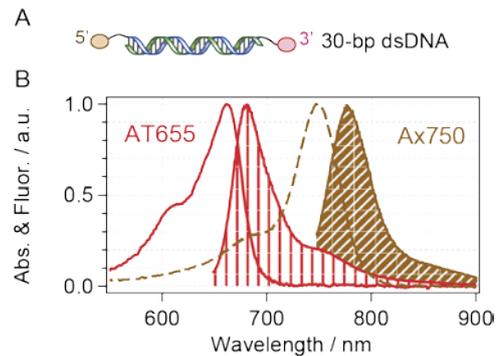


Fig. 2. (A) Structure of dual-labeled DNA. (B) Absorption and fluorescence spectra of AT655 and Ax750.

得られた DNA の長さのヒストグラムを Fig.3B に示す。この図から長さが 10 ± 5 nm と求められた。30 塩基対の DNA の長さは 10.2 nm であり、この方法を用いると、両末端が光でイメージできていることが分かる。Fig.3C はイメージングの結果である。5'-末端と 3'-末端の位置を 4 回繰り返し測定した。5'-末端の測定結果を Δ で、3'-末端の測定結果を \circ で表す。点のばらつきは測定精度を表しており、このイメージング法は真に分子レベルである。

【参考文献】

[1] T. Furubayashi *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 8990 – 8994 (2017).

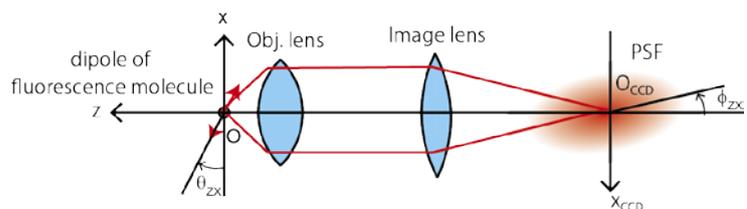


Fig. 4. Schematic diagram of a systematic error due to the dipole irradiation of an individual molecule.