

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19054

研究課題名(和文)細胞内分子イメージングを実現する三次元結像系の開発

研究課題名(英文)Multicolor imaging system for visualizing biomolecules in cells

研究代表者

松下 道雄(Matsushita, Michio)

東京工業大学・理学院・准教授

研究者番号：80260032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはOff-Focus結像系を用いたクライオ蛍光顕微鏡によって、色素1分子の三次元位置を<1 nmの標準誤差で決定することに成功した。しかし、Off-Focus系は背景光に弱いため、細胞のような背景光が高い系には不向きであることが分かってきた。そこで、本課題では、高い背景光除去能力を持ちながら、ナノメートルの精度で三次元位置決定ができるMulti-Focus結像系を開発することを目標とした。その結果、色素の三次元位置を1 nmの精度で決定することに成功した。これは理論値の1.5倍の精度であり、ほぼ理論通りと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顕微鏡が開発されてから400年あまり、様々な顕微鏡が提案されてきた。しかし、細胞内部を分子レベルで見ることができる顕微鏡はいまだない。現在、医学薬学の分野でも分子レベルの研究が進んでいるが、実は最も大事な可視化技術が抜け落ちている。このままでは、生命現象の理解や疾患の克服などを実現することはとても困難である。本課題は、この人類の課題であった「細胞内分子レベルイメージング」を実現するための鍵となる技術であり、学術的にも社会的意義が高いと考えている。

研究成果の概要(英文)：In 2017, we developed cryogenic fluorescence microscope equipped with off-focusing imaging system. The microscope have localized individual fluorophores with angstrom spatial precision. However, the off-focusing imaging is not suitable for a cellular imaging because of a strong autofluorescence of cells. In the present project, we have developed a new cryogenic fluorescence microscope equipped with multifocus imaging system. We demonstrated the multifocus imaging of an individual fluorophore. The three dimensional position was localized with 1 nm precision. The experimental precision is 1.5 times of the theoretical limit.

研究分野：1分子イメージング

キーワード：蛍光イメージ

1. 研究開始当初の背景

顕微鏡には400年以上の歴史がある。その開発当初から生物系の研究に用いられており、様々な顕微鏡が提案されてきた。しかし、未だに細胞内部を分子レベルで観察できる方法はない。今年のノーベル化学賞を受賞した「クライオ電子顕微鏡」でも、電子線の平均自由行程が短いため(数百 nm) 細胞全体を見渡すことが出来ず、電子線照射による試料へのダメージが大きいため生体分子の一分子観察ができない。クライオ電顕は金属表面の観察では原子分解能があるために万能と思われがちだが、生体試料の場合には乗り越えなければならない課題がある。蛍光顕微鏡にはこれらの課題がないかわりに、分解能がクライオ電顕にはるかに及ばなかった。これは2014年にノーベル化学賞を受賞した「超解像蛍光顕微鏡」でも同様である。このため、生命現象の可視化に向けた競争が世界中で繰り広げられている。

2017年、申請者らは Off-Focus 結像系を用いたクライオ蛍光顕微鏡によって、色素1分子の三次元位置を $<1$  nmの標準誤差で決定することに成功した。遅ればせながら、蛍光顕微鏡の三次元分解能も分子レベルに達した。しかも、極低温では色素のスペクトルが細くなるため、スポット内に複数の分子が存在しても、それぞれの分子の位置を個別に決定できる。このように、細胞系への応用の一歩手前まで来ている。しかし、Off-Focus系は背景光に弱いため、細胞のような背景光が高い系には不向きであることが分かってきた。

2. 研究の目的

蛍光顕微鏡は、細胞内部を1分子の感度で測定できる唯一の方法であり、生物学や生命科学の研究には日常的に使われている。しかし、解像度に弱点があり、近年開発された超解像蛍光顕微鏡を用いても、分子レベルには1桁足りない。我々は、2017年、Off-Focus 結像光学系を用いたクライオ蛍光顕微鏡によって、色素1分子の三次元位置を $<1$  nmの標準誤差で決定することに成功した [古林ら; *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 8990 (2017)]. ついに、蛍光顕微鏡の分解能も分子レベルに達した。しかし、Off-Focus系は背景光に弱いため、細胞のような背景光が高い系では、しばしば位置決定が難しくなることが分かってきた。そこで、本課題では、共焦点系と同等の背景光除去能力を持ちながら、ショット雑音限界である Multi-Focus 結像光学系を新たに開発することを目的とする。これにより、前人未踏の細胞内部の分子イメージングを実現する。

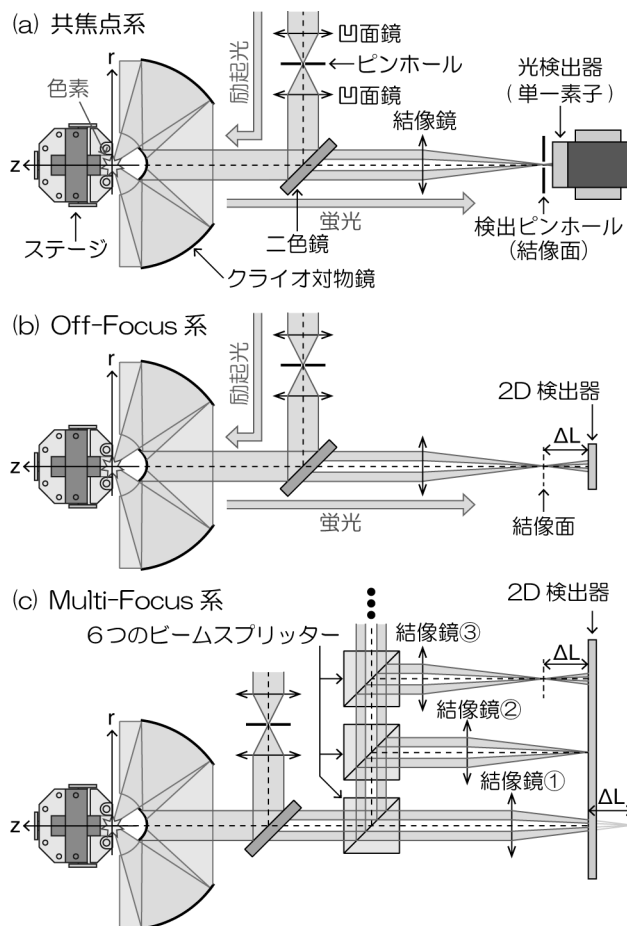


図 1. 3つの三次元蛍光顕微鏡 (a) 共焦点系、(b) Off-Focus系、(c) Multi-Focus系。

表 1. 3つの三次元蛍光顕微鏡の比較。

配置	背景光の除去	明滅雑音の除去
共焦点	○	×
Off-Focus	×	◎
Multi-Focus	○	◎

### 3. 研究の方法

三次元情報を取得する顕微鏡としては様々なものが提案されている。この中で代表的なもの、共焦点顕微鏡と Off-Focus 顕微鏡がある。以下に示すように、両者には欠点があり、これを克服したのが、Multi-Focus 顕微鏡である。まず、共焦点顕微鏡と Off-Focus 顕微鏡の説明をした後に、Multi-Focus 顕微鏡の特長を紹介する。

**3-1. 共焦点顕微鏡の説明** 上に述べた3つの顕微法の中でよく使われるのが、共焦点系である(図 1a)。第一に、励起光の空間モードをピンホールによって整える。第二に、励起光を対物鏡で試料の一点に集光する。第三に、試料からの蛍光を同じ対物鏡で集め、結像鏡によって検出ピンホールに結像する。第四に、ピンホールを通過した蛍光を検出する。この配置では、三次元的に制限された空間から蛍光を検出できる。最後に、ステージを動かして観察すると、三次元空間情報が得られる。このように、ピンホールの効果により、背景光が除去される。一方、共焦点系を1分子観察に用いる欠点は大きな明滅雑音である。

**3-2. Off-Focus 顕微鏡の説明** 我々は明滅雑音を回避するため、Off-Focus 系(図 1b)を採用した。Off-Focus 系が共焦点系と異なる点は、血像系である。結像面から  $\Delta L$  離れた位置で蛍光光子を2次元検出器によって観察する。このような配置で測定すると、画像ぼけが光軸  $z$  方向の位置に依存するため、スポットサイズから  $z$  方向の位置を決定できる。明滅雑音は2次元検出器を用いることでゼロになり(詳細は P.3 に述べる)、共焦点系に比べ高精度な位置決定が可能になる。

**3-3. Multi-Focus 顕微鏡** Off-Focus 系の欠点は背景光に弱いことである。Off-Focus 系には、共焦点系における検出ピンホールが無いため、背景光を除去する能力が弱い。そこで、本申請では、共焦点系と Off-Focus 系の長所を併せ持つ Multi-Focus 系を提案する。

図 1c のように、色素の蛍光はビームスプリッターで6分割され、それぞれ6つの結像鏡で光検出面から  $\Delta L$  だけずれた位置に結像させる。図 2a は Multi-Focus 系で検出される色素1分子の蛍光画像のシミュレーションである。 $|\Delta L|$  が大きくなるとスポットがぼやけていくのが分かる。ちなみに、 $\sigma$  は  $z$  方向のスポット関数の標準偏差である。共焦点系における検出ピンホールの代わりに、データ処理の段階で画像の中心以外をマスクする(図 2b)。その強度を  $\Delta L$  に対してプロットして  $z$  位置を決定する。このマスクにより、共焦点系と同様に背景光が抑制され

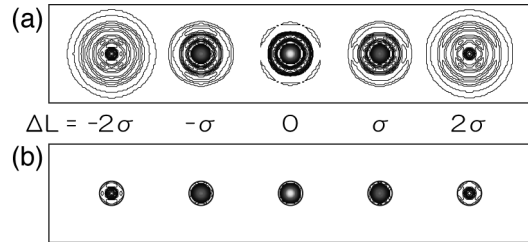


図 2. Multi-Focus 結像系のシミュレーション. マスクなし (a) とあり (b).

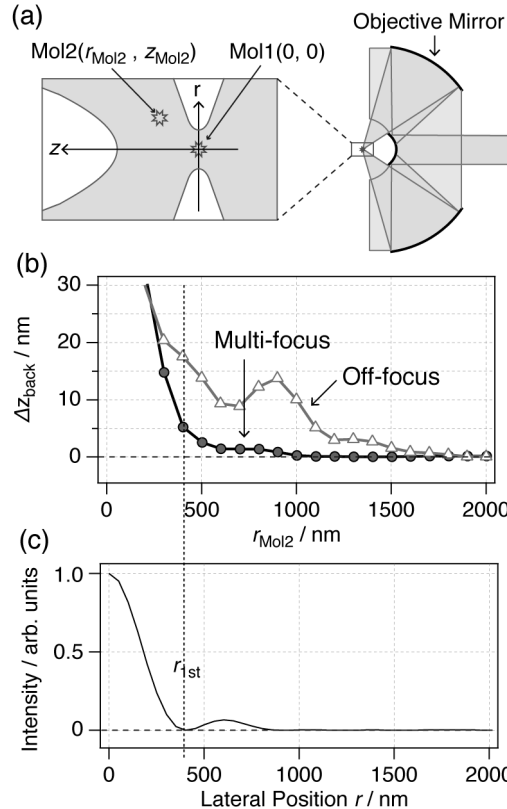


図 3. 背景分子による位置ズレ  $\Delta z_{back}$  の検討. (a) 背景分子の配置. (b) シミュレーション (c) 励起光のスポット関数.

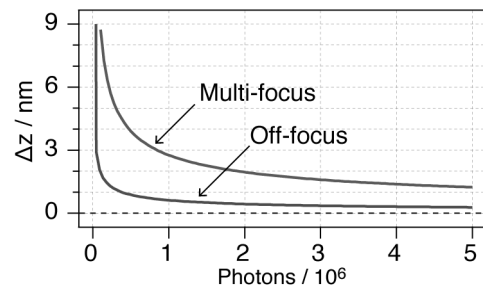


図 4.  $z$  の位置の標準誤差  $\Delta z$  と検出された光子数の関係のシミュレーション.

る。

**3-4. 背景分子の影響** Multi-Focus 系では3次元画像を同時に取得できるために、測定誤差がショット雑音限界になる。以下に、Multi-Focus 系と Off-Focus 系の背景光の影響を比較する。励起波長は 685 nm、蛍光波長は 800 nm として計算した。観察したい分子(Mol1)が焦点、背景となる分子(Mol2)が座標( $r_{\text{Mol2}}$ ,  $z_{\text{Mol2}}$ )に存在する場合を考える(図 3a)。シミュレーションには ZEMAX のホイヘンス PSF を用いて、Mol2 からの背景光が Mol1 の  $z$  位置決定に与えるシフト量  $\Delta z_{\text{back}}$  を計算した。図 3b は、 $z_{\text{Mol2}} = 1000$  nm における Multi-Focus 系および Off-Focus 系での  $\Delta z_{\text{back}}$  の  $r_{\text{Mol2}}$  に対するプロットである。また、励起光のスポット関数を図 3c にしめす。励起光スポットの第一暗環半径( $r_{1\text{st}}$ )よりも背景分子(Mol2)が離れていても、Off-Focus 系では 10 nm 程度の位置シフトが観測されるのに対して、Multi-Focus 系では数 nm に抑えられている。

**3-5. 位置決定精度の比較** 色素 1 分子の  $z$  位置決定精度の比較を行う。図 4 が、 $\Delta z_{\text{back}}$  を除く  $z$  方向の位置決定の標準誤差 ( $\Delta z$ ) である。これを見ると Multi-Focus 系の  $\Delta z$  は、Off-Focus 系よりも 4 倍大きくなってしまふ。これは、Multi-Focus 系では図 2b に示すマスクによって蛍光を遮蔽しており、位置決定に用いる正味の光子数が減っているからである。しかし、実際に得られる  $z$  の位置の誤差には、 $\Delta z_{\text{back}}$  が加わるので、背景光が高い時には Multi-Focus が有効である。

#### 4. 研究成果

当該研究の実施期間である 2018~2019 年度において、2 台の Multi-Focus 顕微鏡を開発した。しかし、顕微鏡の収差に由来する系統誤差により、投稿論文の段階までは進んでいない。すでに、系統誤差に対する対策を理論的に予測しており、来年度も継続して研究を続ける予定である。また、関連した研究として以下にしめす 1 分子イメージングに成功している。

##### (1) タンパク質の分子間相互作用の 1 分子イメージ

二本鎖 DNA(double-stranded DNA, dsDNA) をモデルとして、クライオ蛍光顕微鏡の分子確度を実証した。図 5A に dsDNA の模式図をしめす。合成した dsDNA の塩基対の数は 30 であり、長さ 10.2 nm の直線的な二本鎖を形成する。10 nm というのはタンパク質分子間の距離に対応し、これがイメージできることが実証できれば、顕微鏡としての性能は十分であると言える。

具体的な実験では、dsDNA の 5' 末端と 3' 末端にそれぞれ近赤外(NIR) 蛍光性と赤 (RED) 蛍光性の色素を標識し

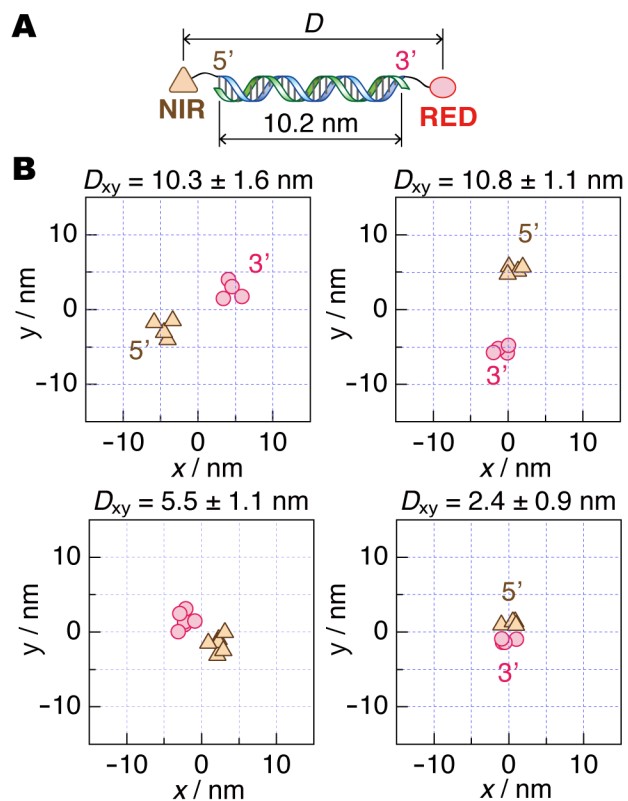


図 5. 分子正確度の実証。(A) 分子定規として用いた二本鎖 DNA の模式図。(B) クライオ蛍光顕微鏡の結果。

た。4 分子の色素標識 dsDNA のクライオ超解像蛍光イメージを図 5B にしめす。観測された 5' 末端の位置を△、3' 末端を○で表している。1 分子あたり 4 回測定したので、それぞれ 4 つの点が画像上にある。各画像を見ると、dsDNA の向きや長さが確認できる。図 5B の上部にあるのが、得られた色素間距離 ( $D_{xy}$ ) と標準誤差である。標準誤差は約 1 nm であり、目標の分子精度に達している。この技術を応用し、Multi-Focus 顕微鏡を完成させたい。

文献 1. 古林 琢・石田啓太・樫田 啓・中田栄司・森井 孝・松下道雄・藤芳 暁

「Nanometer Accuracy in Cryogenic Far-Field Localization Microscopy of Individual Molecules」

*The Journal of Physical Chemistry Letters* • 10 • P. 5841-5846 • 2019 年.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furubayashi Taku, Ishida Keita, Kashida Hiromu, Nakata Eiji, Morii Takashi, Matsushita Michio, Fujiyoshi Satoru	4. 巻 10
2. 論文標題 Nanometer Accuracy in Cryogenic Far-Field Localization Microscopy of Individual Molecules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 5841 ~ 5846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.9b02184">https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.9b02184</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Masanori, Ishii Takaki, Ishida Keita, Toratani Yasuharu, Furubayashi Taku, Matsushita Michio, Fujiyoshi Satoru	4. 巻 115
2. 論文標題 Aberration-corrected cryogenic objective mirror with a 0.93 numerical aperture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Physics Letters	6. 最初と最後の頁 033701 ~ 033701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1063/1.5110546">https://doi.org/10.1063/1.5110546</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tabe Hiroaki, Sukenobe Kei, Kondo Toru, Sakurai Atsunori, Maruo Minako, Shimauchi Akari, Hirano Mitsuharu, Uno Shin-nosuke, Kamiya Mako, Urano Yasuteru, Matsushita Michio, Fujiyoshi Satoru	4. 巻 122
2. 論文標題 Cryogenic Fluorescence Localization Microscopy of Spectrally Selected Individual FRET Pairs in a Water Matrix	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6906 ~ 6911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.8b03977">10.1021/acs.jpccb.8b03977</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井啓暉, 虎谷泰靖, 藤原正規, 石田啓太, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 開口数0.93の収差補正クライオ対物鏡の開発
3. 学会等名 日本物理学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田啓太, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 高開口数蛍光顕微鏡の界面屈折に由来する収差の研究: メニスカスレンズによる収差補正
3. 学会等名 日本物理学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝島研人, 古林琢, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 温度安定化循環水によるクライオ蛍光顕微鏡のナノレベル安定化
3. 学会等名 日本物理学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古林 琢, 中田栄司, 森井孝, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 クライオ蛍光顕微鏡による分子確度イメージングの実現
3. 学会等名 分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田剛, 古林 琢, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 三次元カメラ共焦点顕微鏡によるクライオ1分子イメージング
3. 学会等名 分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝内雄太、石井啓暉、中田栄司、森井孝、藤芳暁、松下道雄
2. 発表標題 DNAオリガミを用いたクライオ超解像蛍光イメージング用色素の探索
3. 学会等名 分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井啓暉、虎谷泰靖、藤原正規、石田啓太、藤芳暁、松下道雄
2. 発表標題 高開口数かつ広視野のクライオ対物鏡
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田 啓太、藤芳暁、松下道雄
2. 発表標題 クライオ蛍光顕微観察における界面屈折に由来する収差の光学シミュレーションによる研究
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古林琢、石田啓太、松下道雄、藤芳暁
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 富永波輝, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 クライオ1分子顕微鏡の機械的安定化
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田 剛, 藤芳 暁, 松下 道雄
2. 発表標題 生体内1分子イメージングのための三次元カメラの開発
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田啓太, 古林琢, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 3次元点像分布関数を測定することによる分子レベル光イメージング: 光学シミュレーション
3. 学会等名 日本物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古林琢, 石田啓太, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 3次元点像分布関数を測定することによる分子レベル光イメージング: 実験
3. 学会等名 日本物理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----