

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21168

研究課題名（和文）細胞全体を高速かつ高精度に観察できるクライオ1分子蛍光イメージング法

研究課題名（英文）Cryogenic single-molecule fluorescence imaging for deep inside of cell

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々が開発してきたクライオ蛍光顕微鏡は位置精度を追求してきたため、高視野での観察が困難になっていた。そこで、本課題をおこなうことで、広い視野かつ高速な画像取得法を得ることで、クライオ蛍光顕微鏡の細胞観察への可能性を大きく広げることを目指した。本研究では、二つのシート励起法を検討した。一つは2個の対物レンズを用いた方法。もう一つは1個の対物レンズを用いた方法である。それぞれを検討した結果、2個の対物レンズを用いた方法が優れていることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はナノレベルのイメージング法を細胞へ応用するために必須の技術であり、学術的な意義は大きい。また、この技術を生体組織や個体に応用していけば、生命の謎を分子レベルで解明することが可能になり、学術的にも社会的にも大きな意義を持った研究となるはずである。

研究成果の概要（英文）：Recently, we have been developing the cryogenic fluorescence microscope for nanometer-level imaging (cryo-nanoscope). Although the cryo-nanoscope could be localized the small biomolecules with a nanometer precision, the field-of-view was as small as the size of cell. Here we study a light-sheet excitation for cryo-nanoscope. We examine the two types of the light-sheet excitation methods by wave optical simulation. As a result, the light-sheet excitation using a two objective lens having a NA of 0.6 was much better than that using a one objective lens.

研究分野：物理化学

キーワード：1分子分光

1. 研究開始当初の背景

我々が開発してきたクライオ蛍光顕微鏡は位置精度を追求してきたため、高視野での観察が困難になっていた。そこで、本課題をおこなうことで、広い視野かつ高速な画像取得法を得ることで、クライオ蛍光顕微鏡の細胞観察への可能性を大きく広げることを目指した。

図1に、蛍光顕微鏡の照明法の例をしめす。(A)には、細胞と対物レンズの配置と座標をしめす。(B)の広視野照明法では、平行光に近い光を試料に照射し、細胞全体の分子を同時に光励起する。この場合、焦平面にある分子の蛍光を同時に観察できるが、焦点から外れた分子からの蛍光がすべて背景光になる。このような高い背景光の下で、1分子からの微弱な蛍光を観察することは不可能である。(C)

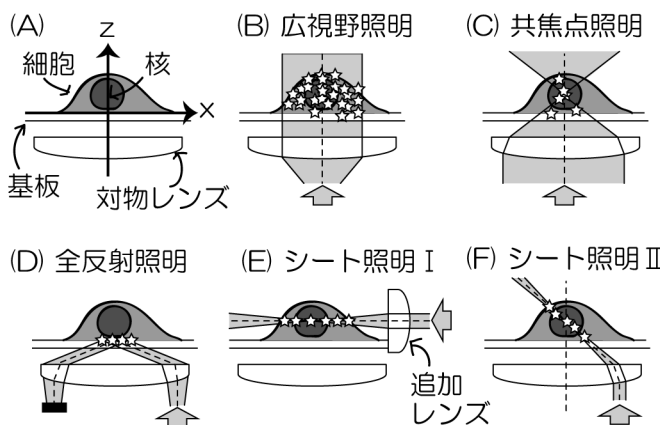


図1. 蛍光顕微鏡の照明法。☆は光励起された色素、⬆は励起光の入射方向をあらわす。

(C)の共焦点照明では、励起光を回折限界までに絞るために、焦点付近の分子を選択的に光励起ができ、低い背景光での観察が可能になる。このため、我々は共焦点照明を用いて、クライオ1分子蛍光イメージングをおこなってきた。しかし、回折限界(体積  $0.1 \mu\text{m}^3$ )に絞った光で一つ一つの分子を光励起していたため、細胞のような大きな物体( $10 \mu\text{m}^3$ )の三次元観察には不向きである。また、焦点から外れた位置からの背景光も大きい。(D)の全反射照明は、室温の1分子蛍光イメージングで最もよく使われている。光励起にエバネッセント光を用いることで、z方向の励起深さが  $0.1 \mu\text{m}$ 、かつ焦平面方向には広がったシート状の光励起が可能である。しかし、全反射条件を満たす表面近傍でしか観察が出来ず、細胞内部の観察は不可能である。よって、B~Dのどの方法でも細胞全体を1分子観察するのは困難であった。

このような背景から、シート照明法(Light sheet または Selective plane illumination と呼ばれている)に注目した。(E)のシート照明は、対物レンズの真横からもう一つの対物レンズによって光励起する。図のようなライン状の光をy方向に対して、ガルバノミラーなどを用いて高速に走査することで、任意のzに対してシート状の光励起が可能になる。シートの厚さ(z方向)も約  $0.3 \mu\text{m}$  程度まで薄くすることができ、全反射照明と同等にすることができる。しかし、クライオスタット内部にある小さい試料ホルダーに、対物レンズ2枚を90度に配置するのはとても困難であった。そこで、当該研究では(F)に示す1枚の対物レンズで実行できるシート照明を用いる[文献1]。

(F)のシート照明では、斜めに光を入射することで、斜めにシート状の光励起をする。これにより、(E)のシート照明と同等の低い背景光の条件で広範囲の画像が測定できる。さらに、レーザーの入射角を変えることで、シートをx方向に平行移動させることができるので、三次元情報が取得できる。

1枚の画像の取得時間を1分として、20~30枚の画像を取得すれば細胞全体の三次元画像が得られるので、約20~30分で1個の細胞全体を観察できる。これは、共焦点照明を用いたクライオ蛍光顕微鏡に比べて、2桁以上高速になる。

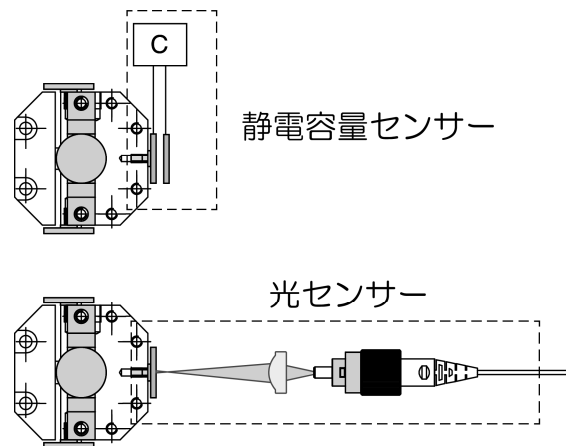
2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞内のナノイメージングを実現するために、広視野かつ高速な画像取得をおこなうための励起光の開発をおこなうことにある。さらなる広視野化をおこなうために、光センサーを用いた低温インサートを開発した。この技術開発により、これまで、1回の試料凍結で数個の細胞しか観察することができなかったが、試料交換なしに、千個以上の細胞が観察できるようになった。

### 3. 研究の方法

#### 光シート励起光の実験および波動光学によるシミュレーション

図1E および 1F に示した「シート照明」および「シート照明」を波動光学によるシミュレーションをした。光学シミュレーションのよって「シート照明」の方がとても良い性質をしめすことがわかった。そこで、「シート照明」を用いた光学系を実際に作成し、実験をおこなった。その結果、理想通りの「シート照明」を実験的につることに成功した。



#### 光センサーを用いた広視野観察

図2に既存の超流動ヘリウムインサートの位置センサーとして静電容量センサーと、新しく導入した光センサーの概略図をしめす。静電容量センサーは超流動ヘリウム中で動作し、ナノレベルの精度を持つため、2011年以降、我々が開発してきたクライオ蛍光顕微鏡に搭載されている。しかし、走査範囲が0.1 mm程度と狭いことが大きな課題であった。そこで、当該研究では、超流動ヘリウムインサートの位置センサーとして光センサーを用いた。光センサーは静電容量センサーよりも位置精度が高く、視野も数ミリメートルという優れた性能が示されていた。

図2. 静電容量センサー（既存）と光センサー。

図2に既存の超流動ヘリウムインサートの位置センサーとして静電容量センサーと、新しく導入した光センサーの概略図をしめす。静電容量センサーは超流動ヘリウム中で動作し、ナノレベルの精度を持つため、2011年以降、我々が開発してきたクライオ蛍光顕微鏡に搭載されている。しかし、走査範囲が0.1 mm程度と狭いことが大きな課題であった。そこで、当該研究では、超流動ヘリウムインサートの位置センサーとして光センサーを用いた。光センサーは静電容量センサーよりも位置精度が高く、視野も数ミリメートルという優れた性能が示されていた。

#### 4-1. 研究成果：光シート励起光の実験および波動光学によるシミュレーション

分解能が高く、シートの広さが大きい光シート励起光を得るために、波動光学を用いたシミュレーション（試算）をおこなった。励起波長は、蛍光タンパク質の観察によく用いられる488 nmでおこなった。はじめに、生細胞の実験で最も使われている共焦点顕微鏡の分解能を試算した。

共焦点顕微鏡では、励起と検出は同一の対物レンズで行われる。そこで、励起と検出の開口半角の正弦( $\sin \theta = 0.9$ )をクライオ蛍光顕微鏡での上限である0.9とした。この時、焦平面での分解能が0.2  $\mu\text{m}$ 、光軸方向の分解能が0.5  $\mu\text{m}$ となった。一方、

表1. シート照明の光学シミュレーション（試算）と実験結果。励起波長は488 nm。参考のために共焦点顕微鏡の試算も合わせて載せる。

	検出の $\sin \theta$	励起光の $\sin \theta$	焦平面での 分解能 / $\mu\text{m}$	光軸方向の 分解能 / $\mu\text{m}$	シート励起光の 広さ / $\mu\text{m}$
共焦点顕微鏡（試算）	0.9	0.9	0.2	0.5	ポイント励起
シート照明 I（試算）	0.6	0.6	0.4	0.24	150
シート照明 I（実験）	0.6	0.6	0.4	0.3	60
シート照明 II（試算）	0.9	0.05	0.3	1	20

共焦点顕微鏡では、励起光は一点に絞るポイント励起なので広い画像を取得するのに長い時間がかかる。

シート励起の試算について示す。シート励起では、2個の対物レンズを用いる。このため、 $\sin = 0.9$ にはさまざまな組み合わせが考えられる。光学シミュレーションの結果、 $\sin = 0.6$ の対物レンズを図 1E のように直角に置くのが分解能やシ

表 2. 温度 1.8 K の超流動ヘリウム中における光センサーと静電容量センサー（既存）を用いたインサートホルダーの安定性と走査範囲.

	光センサー	静電容量センサー
x- 安定性 in RMS	0.33 nm	1.7 nm
y- 安定性 in RMS	0.29 nm	0.72 nm
z- 安定性 in RMS	0.25 nm	2.6 nm
x- 走査範囲	6 mm	0.15 mm
y- 走査範囲	5 mm	0.15 mm
z- 走査範囲	3 mm	0.10 mm

ートの広さの面のバランスを考えると適切であることがわかった。その結果、焦平面での分解能が  $0.4 \mu\text{m}$ 、光軸方向の分解能が  $0.24 \mu\text{m}$ 、シートの広さが  $150 \mu\text{m}$  となった。焦平面での分解能 ( $0.4 \mu\text{m}$ ) が共焦点顕微鏡にやや劣るものの、光軸方向の分解能 ( $0.24 \mu\text{m}$ )、シートの広さ ( $150 \mu\text{m}$ ) はともに優れており、細胞のような大きな構造体 ( $10$  から  $20 \mu\text{m}$ ) を測定するには適していると考えられる。

シート励起の試算について示す。シート励起では、図 1F のように、1個の対物レンズを用いる。このため、その対物レンズの  $\sin$  は限界である  $0.9$  に設定できる。ところが、励起光はなるべく光軸方向に傾斜した光を入れなければならないため、 $\sin$  の限界が  $0.05$  程度になる。このため、焦平面での分解能は  $\sin = 0.9$  の検出の対物レンズで決まるためにシート励起よりも優れているが、低い励起光の  $\sin$  ( $0.05$ ) のために光軸方向の分解能が  $1 \mu\text{m}$  と低くなってしまふ。さらに、シート励起の広さも  $20 \mu\text{m}$  と細胞の大きさと同程度であり、十分とは言えない。よって、本研究から、シート励起がクライオ蛍光顕微鏡には適していると結論した。

次に、シート励起の光源を実際に作成した。その結果、試算よりは若干おとるものの、十分な性能の励起光を得ることができた。

#### 4-2. 研究成果：光センサーを用いた広視野観察

表 2 に、温度 1.8 K の超流動ヘリウム中におけるインサートホルダーの安定性と走査範囲をしめす。光センサーを用いると、三次元すべての方向に対して数の安定性が得られた。さらに、この状態を数時間に渡り保持できることも実験的に確認している。これは、既存のインサートホルダーで用いていた静電容量センサーに比べて、1桁高い安定性である。

高い安定性に加えて、試料の走査範囲は 3 から 6 mm になった。この走査範囲はクライオステージの移動範囲やインサートの壁によって制限されている。また、静電容量センサーに比べて桁違いに広がっていることがわかる。

図 3 に、光センサーを用いたインサートホルダーで観察した HeLa 細胞のラミン A/C の共焦点蛍光画像をしめす。試料、対物鏡、光センサーは温度 1.8 K の超流動ヘリウムに浸した状態で観察した。図には、約百個の細胞核が見えている。この画像は試料交換をせずに一度に測定したものである。一方、従来用いていた静電容量センサーの走査範囲をこの画像の上に四角でしめす。このように、走査範囲が狭く、一度の冷却で数個の細胞核しか測定できない。冷却から試料取り出しまで、約 2 日かかるため、静電容量センサーを用いた方法では実験がきわめて非効率であることがわかる。

この成果は現在論文執筆中である。

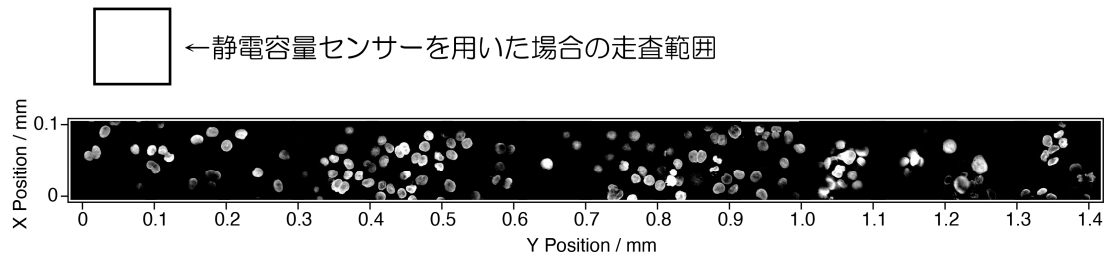


図 3. 光センサーを用いたインサートホルダーで観察した HeLa 細胞のラミン A/C. 試料、対物鏡、光センサーは温度 1.8 K の超流動ヘリウムに浸した状態で観察した.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ishida Keita, Naruse Kanta, Mizouchi Yuta, Ogawa Yoshihiro, Matsushita Michio, Shimi Takeshi, Kimura Hiroshi, Fujiyoshi Satoru	4. 巻 46
2. 論文標題 Variable immersion microscopy with a high numerical aperture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optics Letters	6. 最初と最後の頁 856 ~ 856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/ol.416006	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 Kondo Toru, Mutoh Risa, Tabe Hiroaki, Kurisu Genji, Oh-Oka Hirozo, Fujiyoshi Satoru, Matsushita Michio	4. 巻 11
2. 論文標題 Cryogenic Single-Molecule Spectroscopy of the Primary Electron Acceptor in the Photosynthetic Reaction Center	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 3980 ~ 3986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.0c00891	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 Furubayashi Taku, Ishida Keita, Nakata Eiji, Morii Takashi, Naruse Kanta, Matsushita Michio, Fujiyoshi Satoru	4. 巻 124
2. 論文標題 Cryogenic Far-Field Fluorescence Nanoscopy: Evaluation with DNA Origami	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 7525 ~ 7536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpccb.0c04721	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 Toru Kondo, Risa Mutoh, Shun Arai, Genji Kurisu, Hirozo Oh-oka, Satoru Fujiyoshi, and Michio Matsushita	4. 巻 156
2. 論文標題 Energy transfer fluctuation observed by single-molecule spectroscopy of red-shifted bacteriochlorophyll in the homodimeric photosynthetic reaction center	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Chem. Phys.	6. 最初と最後の頁 105102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0077290	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 成瀬寛太、石田啓太、溝内雄太、松下道雄、志見剛、木村宏、藤芳暁
2. 発表標題 可変浸レンズ：実験とシミュレーション
3. 学会等名 分子科学会 オンライン討論
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝内雄太、成瀬寛太、松下道雄、工藤史貴、佐藤優子、木村宏、藤芳暁
2. 発表標題 反応性FRETペアによる細胞内標識
3. 学会等名 分子科学会 オンライン討論
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成瀬寛太、石田啓太、溝内雄太、松下道雄、志見剛、木村宏、藤芳暁
2. 発表標題 液中の深いところの顕微観察を可能にする可変浸レンズ
3. 学会等名 日本物理学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成瀬寛太、武藤慶、宮崎龍也、山口潤一郎、松田剛、溝内雄太、志見剛、木村宏、松下道雄、藤芳暁
2. 発表標題 近赤外蛍光プローブを利用した三次元ナノスコーピー
3. 学会等名 日本物理学会2021年秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯本達也, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 波動光学による光シート顕微鏡の照射系に関する研究
3. 学会等名 日本物理学会2021年秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷直輝, 滝島研人, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 温度4 Kにおける光干渉計による試料ステージの安定化についての研究
3. 学会等名 日本物理学会2021年秋季大会
4. 発表年 2021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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関