

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16084

研究課題名(和文)細胞内1分子動態計測のための新規構造化照明超解像顕微鏡の開発

研究課題名(英文)Development of a novel structured illuminated super-resolution microscope for intracellular single molecular dynamics

研究代表者

池崎 圭吾 (IKEZAKI, Keigo)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：10722960

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文): 構造生物学の進展により、タンパク質の動的構造変化、特に細胞内での構造動態に注目が集まっている。本研究では、細胞内において1分子レベルでタンパク質の構造動態を計測するために、蛍光1分子計測顕微鏡法に超解像顕微鏡法の原理(構造化照明法)を応用し、計測精度を飛躍的に向上させた新規顕微鏡の開発を行った。その結果、本研究で開発した装置を用いることで理論限界に近い位置推定精度を実現できていることが確認できた。これは従来の全反射顕微鏡型の1分子計測システムに比べて約100倍の光子利用効率に相当する。本装置を開発したことにより、細胞内においてタンパク質1分子の動態を実時間計測する道が開けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の主題である細胞内のタンパク質の実態解明は学術的にきわめて重要な問題であり、様々な分野の研究者達が盛んに研究を行っている。1分子研究分野においても、細胞内での1分子計測が試みられているが計測技術の限界により、細胞内での分子の局在や並進移動を捉えることがやっと出来るという状況であり、1分子の構造変化を詳細に計測するには至っていない。このような研究動向の中において本研究で開発した計測装置は非常に大きなインパクトを世界に与えるとともに、本装置がこれからのタンパク質機能解析の基盤技術の1つとなると期待する。

研究成果の概要(英文): In this study, in order to measure the structural dynamics of a single molecule protein in a cell, the principle of super-resolution microscopy (structured illumination method) is applied to the fluorescence single-molecule measurement microscopy, and the measurement accuracy is dramatically improved. As a result, it was confirmed that the position estimation accuracy close to the theoretical limit can be realized. This accuracy corresponds to about 100 times the photon utilization efficiency of the conventional total internal reflection microscope. The development of this device has opened the way for real-time measurement of the dynamics of a single molecule protein in the cell.

研究分野：生物物理

キーワード：超解像顕微鏡 1分子計測

1. 研究開始当初の背景

X線結晶回折やクライオ電子顕微鏡法などの構造生物学的手法の飛躍的進展により、タンパク質の立体構造解析が急速に進んでいる。こうして得られた静的構造からタンパク質の機能を理解するためには、この構造がどのように動的に変化するかという構造動態の情報が重要である。

特に近年、細胞内混雑環境がタンパク質の構造や機能に大きな影響を与える可能性が理論・実験両面より示唆されており、細胞内でタンパク質の構造動態を計測する一般的な手法へのニーズが高まっている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内において一分子レベルでタンパク質の構造動態を計測するために、蛍光一分子計測顕微鏡法に超解像顕微鏡法の原理(構造化照明法)を応用することで計測精度を飛躍的に向上させ、タンパク質の動的構造変化の実時間計測を実現する。

3. 研究の方法

超解像顕微鏡法は、蛍光分子局在化法と構造化照明法および誘導放出制御法の2つに大別することが出来る。前者は、蛍光分子の画像からその中心位置を推定する技術をベースとしており、既存の蛍光一分子計測法の延長である。その位置推定精度は蛍光強度の平方根に比例する。蛍光分子1個から得られる光子数は有限である(photon budget)ため、高速化と高精度化はトレードオフの関係にあり、従来の蛍光一分子計測法の限界を規定している。そこで、本研究では、後者の技術に注目することで、従来の蛍光一分子計測法の限界を破る。

構造化照明法と誘導放出制御法は、一見異なる技術であるが、いずれも《励起光の形状(強度分布)情報を標識の位置推定に利用する》。そのため、分解能/精度は光子数に依存せず、励起光強度分布の形状・精度・強度などで定まる。従って、従来の蛍光一分子計測法の原理的制約であった、時間分解能と空間分解能のトレードオフを根本的に解消することが出来る。

本研究では、まず、この新しい原理に基づく一分子計測法を、暗視野照明法と組み合わせる。金ナノ粒子からの散乱光の検出では、褪色やプリンキングなど蛍光色素特有の問題点が存在せず、原理実証実験に最適である。しかし、散乱光を用いた計測では、分子内の2ヶ所を標識し、その相対位置の変化を計測することは困難である。そこで、原理実証実験に成功し、計測法の原理が実証された時点で、蛍光一分子計測へと発展させる。

4. 研究成果

まずは本研究で実施する超解像顕微鏡の性能検証のため単色励起による走査型構造化照明顕微鏡システムの立ち上げを行った。本計測システムにおいて、構造化照明の精度はシステム全体の精度に直接つながる大事な点である。当初使用していたポルテックスフェイズプレートでは、各光学素子で発生するわずかな波面歪みを補正することができずに構造化照明に歪みが生じていたが空間光変調器を用いてザイデル収差を補正しつつビーム整形することにより、構造化照明の質を大幅に向上することに成功した(図1)。

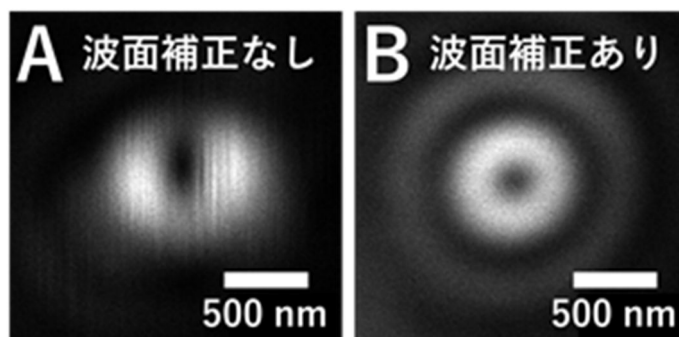


図1

当初の研究計画では、原理検証の第一段階として蛍光観察に比べて信号が安定な暗視野計測系でシステム構築を行う予定であったが、大過の影響により研究期間が制限されてしまったため研究計画を見直し、暗視野観察系での検証は省略することにし、最終目標である蛍光観察系でのシステム構築を行った。

上記の構造化照明超解像顕微鏡原器を用いて蛍光ビーズ計測を行い、最尤推定法をベースにした位置推定アルゴリズムを用いた精度解析を行った。その結果、本装置を用いることで従来の全反射型一分子蛍光顕微鏡の光子利用効率を約 100 倍上回る性能を達成することができた(図 2)。また、本装置に高速フィードバック制御装置を実装し、ミリ秒オーダーで蛍光粒子を追跡することにも成功し、タンパク質 1 分子の動態を高速で計測するための計測基盤が完成した。

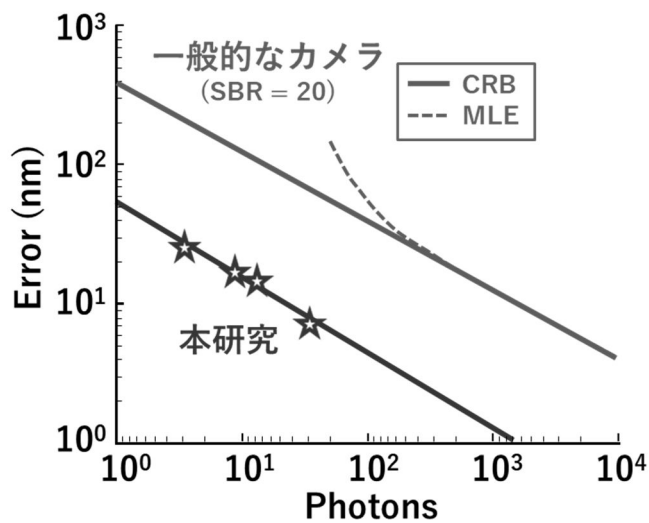


図 2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------