

令和 3 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：2019～2020

課題番号：19K22162

研究課題名（和文）生体試料の深部のクライオ1分子イメージング

研究課題名（英文）Development for single-molecule deep imaging method of biological sample under cryogenic conditions

研究代表者

藤芳 暁（Fujiyoshi, Satoru）

東京工業大学・理学院・助教

研究者番号：70371705

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）：高い開口数の対物レンズを用いて、厚みのある生体試料を回折限界の性能を得ようとするのは困難である。当該プロジェクトでは、このようなイメージングを可能にする可変浸レンズシステムを開発した。その結果、大きさ50ミクロンの乳腺細胞の細胞塊などの厚みのある生体試料を正しく画像化ができることを実験的にしめた。この成果は原著論文として報告済みであり、広く科学者に成果を紹介している。今後は生理条件およびクライオ条件での実験成果を通じて、社会に貢献したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細胞内の小器官を測定する場合、培養細胞ぐらいの厚さ（10ミクロン）がせいぜいで組織レベルの試料になると細胞ごとの分解能が限界であった。我々の提案する方法は生体組織の中の小器官を鮮明に取得できる方法であり、とても大きな意義があると考えている。この技術は医学、薬学にもすぐに応用できる方法であり、こちらの方向を伸ばすことで社会に貢献したい。

研究成果の概要（英文）：Three-dimensional optical microscopy with a high numerical aperture (NA) remains challenging for thick biological specimens owing to aberrations arising from interface refractions. In this project, we have developed a variable immersion lens (VIL) for deep fluorescence imaging. A VIL is a high-NA concentric meniscus lens and was used in combination with an aberration-corrected high-NA reflecting objective (TORA-FUJI mirror). VIL microscope enables diffraction-limited 1.2-NA imaging in water (refractive index of 1.34) at a depth of 0.3 mm by minimizing aberrations due to refraction of a sample interface. Another aberration due to refractive index mismatching between a mounting medium and an object can be also corrected by the VIL system because various fluids with different refractive indexes can be used as mounting media for the VIL. As a result, we have demonstrated that a cell spheroid can be imaged at a true dimension.

研究分野：物理化学

キーワード：1分子観察 可変浸レンズ 蛍光顕微鏡 三次元イメージング 生体試料

1. 研究開始当初の背景

たった一つの生命現象を発現させるためにも、無数の分子が働いている。しかも、これらの分子は単独ではなく、ネットワークをつくり機能している。このような複雑系の実体を理解する第一歩は、その現場である細胞内部や生体組織を分子レベルで画像化し、分子同士の相互作用の様子を分子ごとに知ることである。しかし、このような画像化は実現していない。我々は凍結試料のための蛍光顕微鏡（クライオ蛍光顕微鏡）に注目し、15年間研究を続けてきた。実に20台のクライオ蛍光顕微鏡を開発した結果、ナノメートルの精度で個々の色素の三次元位置を1分子観察することに成功した。

我々が達成した精度と既存の方法を比較する。図1Aは小さいタンパク質である GFP の立体構造である。我々が達成した分子精度 σ に対応する半径 2σ の球を図1Bにしめす。半径 2σ の球と GFP のサイズはほぼ同じであり、分子レベルの精度であることが分かる。この精度は、生体観察におけるクライオ電子顕微鏡（2017年ノーベル賞、図1C）や超解像蛍光顕微鏡（2014年ノーベル賞、図1D）をしのぎ、真に分子レベルである。ところが、この方法を厚みのある試料（厚さ $>10\ \mu\text{m}$ ）に用いると、位置決定精度が著しく低下することが分かってきた。そこで、当該研究では、唯一残る実験的な壁を突破し、真に分子レベルの細胞、生体組織の深部イメージングをするため、「可変浸レンズ」を開発する。

2. 研究の目的

生命現象は複数の生体分子が相互に作用しながら発現する複雑系である。このような複雑系の実体を知るためには、その現場である細胞や生体組織を分子レベルで観察することが不可欠である。しかし、そのような観察は実現してしない。そこで、本研究の目的は、この生体試料のための分子イメージング法を世界にさきがけて実証することにある。これまで、我々はこの目標に向けて、クライオ蛍光顕微鏡を独自開発し、薄膜試料中（厚さ数ミクロン）にある色素の三次元位置を精度 $1\ \text{nm}$ で1分子観察することに成功している。ところが、この方法を細胞や生体組織のような厚い試料（厚さ $10\ \mu\text{m}$ 以上）に用いると、位置決定精度が著しく低下することが分かってきた。この精度の低下は、試料の界面屈折が原因である。そこで、当該研究では、界面屈折の影響をゼロにする「可変浸レンズ (Variable Immersion Lens, VIL)」を開発し、前人未踏の生体試料深部の分子イメージングを挑戦する。

3. 研究の方法

界面屈折による位置精度の低下

蛍光顕微鏡で観察する試料の表面には、空気/水（または油/水などの）界面が存在する。試料表面は平らな場合が多く、平らな界面で光が屈折すると収差が生まれ、顕微鏡の分解能と検出効率が大きく低下する[参考文献 1]。例えば、高開口数(0.6 以上)の対物レンズでは、深さ十ミクロンくらいから光学性能が悪化し

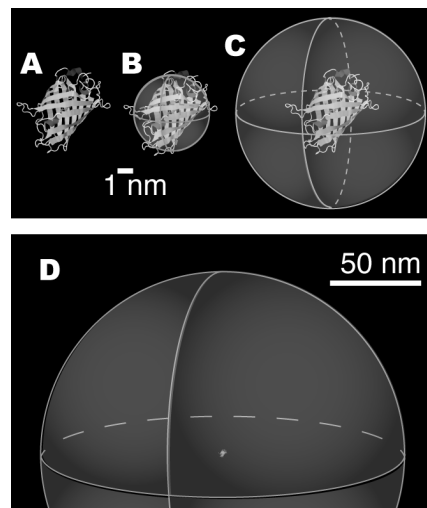


図1. 分子精度とは. (A)リボン表示した GFP. (B)分子精度 $1\ \text{nm}$, (C)クライオ電子顕微鏡の三次元精度 $3\ \text{nm}$. (D) 超解像蛍光顕微鏡の三次元精度 $50\ \text{nm}$

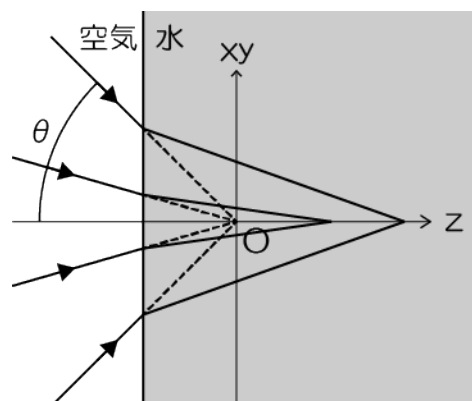


図2. 界面屈折による収差の発生のメカニズム. 点線は界面がない場合、実線は界面がある場合の光路. 理想的なレンズで集めた光線が左側から入って来る場合を想定.

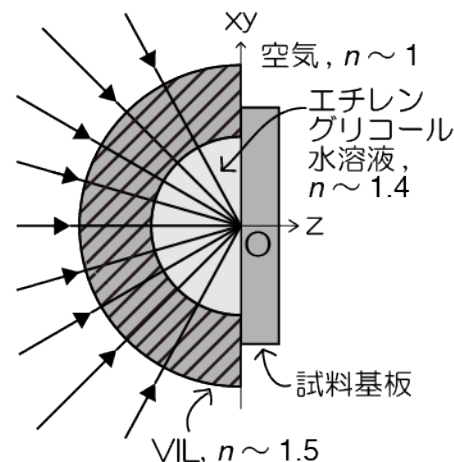


図3. 可変浸レンズ VIL.

始める。このため、蛍光顕微鏡でも、細胞や組織のような厚みのある試料全体を正しく画像化することは難しい。

図2に、精度低下の模式図をしめす。空気/水界面に、理想レンズで光を集めた場合を考える。試料の界面がない場合にはすべての光線は焦点Oに集光する(図2の点線の光路)。一方、界面がある場合は屈折し、入射角度 θ が大きい光線ほど深い所に集光する(図1の実線の光路)ため、特に蛍光スポットがz方向に延びてしまう。1分子イメージングの位置決定精度は蛍光スポットの大きさに比例するため、精度が低下する。そこで、当該研究では、界面屈折の影響をゼロにできるVILLを開発する。

[参考文献 1] S. Hell et al.; *J. Microsc.* **169**, 391-405 (1993).

VIL のデザイン

図3はVILの光学配置である。VILは、石英ガラス製のメニスカスレンズであり、光の焦点を曲率中心とする凹凸面からなる(図中斜線部分)。試料基板はWIMLに貼り付けて使う。試料基板とVILとの間の空間は、細胞や生体組織の屈折率 n に合わせたエチレングリコール水溶液($n \sim 1.4$)で浸す。こうすると、すべての光線が界面に対して垂直入射になるため、界面屈折の影響を受けない。

図4はVILを我々が開発した低温用対物レンズ(クライオ対物鏡)と組み合わせた時の配置である。クライオ対物鏡は、球面鏡と非球面鏡からなる反射型の対物レンズである。2枚の鏡は石英ガラス表面にアルミをコートして一体成形しているため、低温で動作する。クライオ対物鏡の特長は大きな開口数 $NA(=0.99)$ であり、原理限界(1.04, 超流動ヘリウム中)に限りなく近い値になっている。このクライオ対物鏡は焦点付近が大きく空いているので、VILと組み合わせることができる。このVILの唯一の欠点は光学研磨の難しさであったが、協力工場と連携して、VILの実現に成功した。

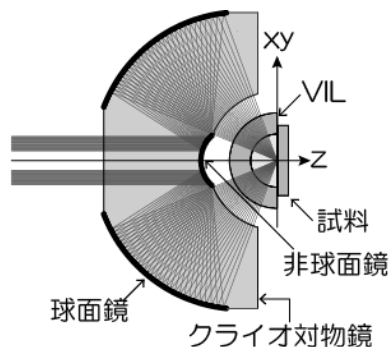


図4. クライオ対物鏡との組み合わせ.

4. 研究成果

図5aは、 $NA = 1.4$ の理想的な油浸対物レンズの分解能(点像分布関数の半値全幅)のカバーガラス表面からの深さ z に対する依存性の光学シミュレーションである(波長 488 nm)。これを見ると、焦平面(xy)方向の分解能は z に対して大きく変化しないが、 z 分解能は急激に悪化していることが分かる。詳しくみると、カバーガラスに近い位置($z = 0.7 \mu\text{m}$)では z 分解能は $0.47 \mu\text{m}$ であり、 $NA=1.2$ の理想的な水浸対物レンズの(z 分解能 $0.64 \mu\text{m}$)よりも優れている。つまり、全反射顕微鏡のようにカバーガラス近傍を測る場合には、油浸対物レンズが最も優れていることを表している。これに対して、 $z = 12 \mu\text{m}$ になると分解能が $1 \mu\text{m}$ に悪化する。つまり、ほ乳類細胞ではカバーガラス近傍と細胞上部では分解能が違うことになる。その後も深さ z に比例して z 分解能が悪化していく。

この問題を解決する一つの解が「可変浸レンズ」である。可変浸レンズは高開口数の反射対物レンズ「虎藤鏡, $\sin \theta = 0.9$ 」と組み合わせて、図4のように使用する。励起光(平面波)は虎藤鏡によって理想的な球面波に変換される。球面波のすべての光線は可変浸レンズの2つの界面(空気/ガラスとガラス/封入剤)において垂直入射となるので球面収差が生じない。このため、図5bのように、可変浸レンズに対して虎藤鏡の位置を動かすことで試料内部を見た場合、深さ0.3 mmまでxyzのどの分解能も回折限界の性能に等しくなることが分かった。これは、油浸対物レンズと比べて2桁以上、水浸対物レンズやシリコン浸対物レンズ(NA

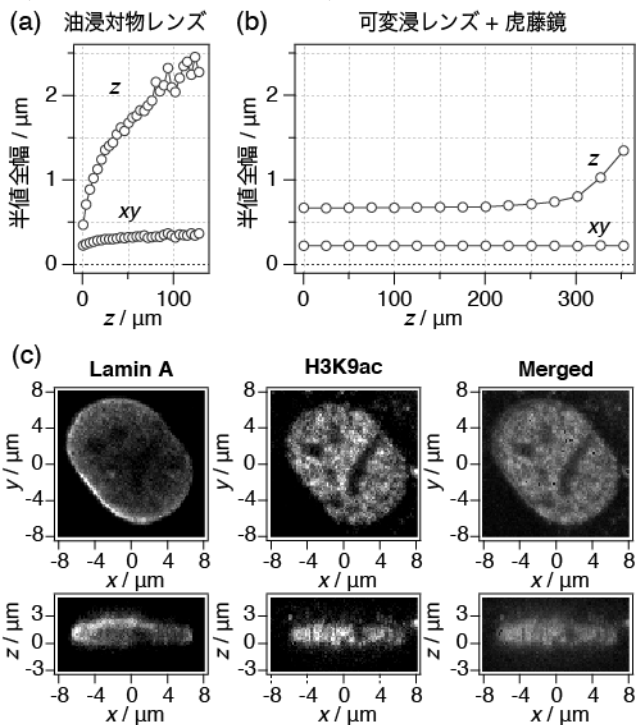


図5. (a)油浸対物レンズと(b)可変浸レンズシステムの分解能。(c) hTERT-RPE1 細胞核内のラミン(637 nm 励起)とヒストン(488 nm 励起)の蛍光画像。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

= 1.2) と比べても1桁優れている。

図5cに、可変浸レンズと虎藤鏡を用いたラミン (Lamin A) とアセチル化ヒストン (H3K9ac) の蛍光画像をしめす。細胞核にあるラミンとヒストンが画像化されている。実は、この画像、査読中にボツになったものであり、Opt. Lett.誌には厚さ 50 μm のヒト乳腺上皮細胞スフェロイドのヒストン H2B-mCherry 蛍光画像が載っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 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) 10.1063/1.5110546	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, 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) 10.1021/acs.jpcllett.9b02184	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 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.jpcc.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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤芳 暁
2. 発表標題 三次元カメラ共焦点クライオ(C3)蛍光顕微鏡
3. 学会等名 放射線影響学会 (招待講演)
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 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 藤芳 暁
2. 発表標題 超流動ヘリウム1分子分光で見たタンパク質の中の水素結合
3. 学会等名 量子生命科学会第二回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤芳 暁
2. 発表標題 Single-molecule nanoscopy by using cryogenic fluorescence microscopy
3. 学会等名 日本顕微鏡学会（招待講演）
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 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 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 顕微鏡	発明者 藤芳暁、石田啓太	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-041367	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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