

# 色素修飾を必要としない単一タンパク質分光 Single-protein spectroscopy without dye-labeling

(個人推薦)

代表研究者 東京工業大学 藤芳 暁 Tokyo Institute of Technology Satoru FUJIYOSHI

An advantage of single-molecule fluorescence imaging is the localization precision of molecule beyond the diffraction limit. Although longer signal-acquisition yields a nanometer precision, acquisition time at an ambient temperature is limited by photobleaching, thermal diffusion, and so on. At low temperature of a few kelvins, much longer acquisition is possible and will improve precision if the sample and the objective are held stably enough. The present work examined holding stability of the sample and objective at 1.5 K in superfluid helium in the helium bath. The stability was evaluated by localization precision of a point scattering source of a polymer bead. Scattered light was collected by the objective, and imaged by a home-built rigid imaging unit. The standard deviation of the centroid position determined for 800 images taken continuously in 17 min was 0.5 nm in the horizontal and 0.9 nm in the vertical directions.

## 研究目的

タンパク質には、天然状態で可視の蛍光団を持つものがある。このような蛍光団を利用して低温1分子分光をおこなえば、色素の修飾せずに、天然状態のタンパク質をとらえることができる。このような目標の元、我々は低温で使える反射対物レンズや反射顕微鏡の開発をおこなってきた。その結果、Green Fluorescent Protein やビタミン B<sub>2</sub> 誘導体を結合した光センサータンパク質の温度数ケルビンの1分子分光に世界ではじめて成功した[1,2]。本課題は、この顕微技術をさらに発展させ、紫外蛍光性の芳香族アミノ酸の低温1分子分光に挑戦するものである。芳香族アミノ酸は、タンパク質を構成するアミノ酸であり、ほとんどすべてのタンパク質が持っている。もし、芳香族アミノ酸を1分子観測する技術を獲得すれば、ほぼ全てのタンパク質を色素修飾無しに分析できることになる。しかし、残念ながら研究期間中には、芳香族アミノ酸からの信号をとらえることができなかった。この実験の難しさは、(1) 芳香族アミノ酸の光退色が早いことと (2) 励起波長が紫外(280 nm)であるために高い背景光が発生することにある。(1)については、集光の立体角を向上させ、

微弱な信号をとらえられるようにすること、(2)については、空間分解能を向上させ、目標の分子からの信号を空間的に分離することで解決できる。これら2つの問題は、共に対物レンズの開口数 NA を向上させることが有効である。そこで、我々は新たな反射対物レンズを開発している。その結果、これまで用いていた反射対物レンズの NA=0.53 から、NA=0.97 という空気中の原理限界 (NA=1) に近い反射対物レンズの開発に成功した[3]。これにより、集光立体角が5.2倍向上し1.2 str となった。また、空間分解能は焦平面方向で2倍向上し0.32 μm となり、光軸方向で5倍向上し1.2 μm となった。都合、空間分解能は20倍向上した。これらの技術革新により、近い将来、芳香族アミノ酸の低温1分子分光が実現するはずである。

芳香族アミノ酸の低温1分子分光が実現した後、次の課題は、芳香族アミノ酸同士の相対位置をナノメートルの精度で観測することである。そのためには、低温の光学顕微鏡の機械的安定性をそのレベルまで引き上げなければならない。そこで、我々は低温の顕微鏡の機械的安定性を検査する方法論を開発したので、以下に紹介する。

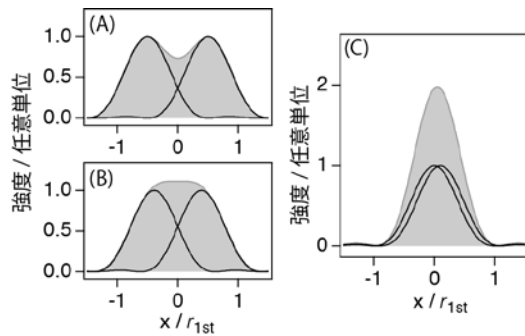


図1. 2つの分子からの蛍光像。分子1と2からの蛍光を実線であらわした。2つの分子からの蛍光が同時に観測された場合には、灰色に塗りつぶした領域のような信号が観測される。(A) レイリー限界:  $r_{AB} = r_{1st}$ 。(B) スパロー限界:  $r_{AB} = 0.78 r_{1st}$ 。(C)  $r_{AB} = 0.1 r_{1st}$ 。

生体試料の観察において、Far-field 蛍光顕微鏡は、非接触で、試料の厚さ方向を含む3次元情報が得られ、かつ一分子レベルの感度を持つ強力な方法である。しかし、光の回折現象のために、分子やタンパク質の大きさに比べて、1〜2桁空間分解能が低いという原理的な制約がある。例えば、1個の分子が発する波長 $\lambda$ の蛍光を、理想的な蛍光顕微鏡で観測した場合、得られる蛍光画像は、エアリー関数となる。強度の極大から、初めて強度がゼロになる距離 $r_{1st}$ は第1暗環半径と呼ばれ、 $r_{1st} = 0.61 \lambda NA^{-1} M$ で表される(NA: 対物レンズの開口数、M: 顕微鏡の倍率)。レイリーの定義では(図1A)、二つの分子からの蛍光像の距離 $r_{AB}$ が $r_{1st}$ に一致する場合( $r_{AB} = r_{1st}$ )が、それぞれの像が分離して見える限界であると、これを空間分解能としている。よって、試料位置ではMを割り算した距離 $r_{1st\_obj} = 0.61 \lambda NA^{-1}$ がこれに対応する。NAの限界値は $\sim 1.5$ であり、 $\lambda = 0.50 \mu\text{m}$ とすると、 $r_{RES} \sim 0.20 \mu\text{m}$ となる。また、レイリーの定義と同様に有名なスパローの定義(図1B、 $r_{AB} = 0.78 r_{1st}$ )では、 $r_{RES} \sim 0.16 \mu\text{m}$ となる。いずれにせよ、可視光による分解能の限界 $r_{RES}$ は、分子やタンパク質の大きさに比べて1〜2桁大きい。

2分子間の距離で定義される空間分解能に対して、蛍光像の位置決定の精度は光子数ゆらぎで決まり、光子数の平方根に比例して精度が向上する[4]。もし、二つの分子を別々に蛍光させることが出来れば、スパロー限界はもとより、 $r_{AB} = 0.1 r_{1st}$ の条件(図1C)でも、それぞれの位置の違いを蛍光イメージから求めることができる。

このような1分子の位置決定は、1995年にT. Schmidtらによって実験的に示された。彼らは、室温下(300 K)で、色素1分子の位置を30 nm ( $r_{AB} \sim 0.1 r_{1st}$ の条件)の精度で決定した[5]。現在では、顕微鏡の機械的ドリフトをアクティブ制御することで、

色素分子の大きさと同程度( $< 1 \text{ nm}$ 、 $r_{AB} < 0.01 r_{1st}$ の条件)の精度で色素1分子の位置を決定できる方法や[6]、STORM(stochastic optical reconstruction microscopy)という光学課程を用いて、回折限界よりも近接した複数の分子の位置を $< 10 \text{ nm}$ の精度で決定する方法[7]が開発されている。一方、2002年、Matsushitaらは、温度数ケルビンでは、回折限界内にある数百個の分子の位置を数nmの精度で決定した上で、それぞれの分子のスペクトルと配向を1分子ごとに取得できることを報告している[8, 9]。

室温、低温を問わず、これらの実験の成功の鍵は、蛍光顕微鏡の機械的安定性を、目的とする精度よりも高くすることにかかっている。しかし、一般に、顕微鏡の機械的安定性は回折限界(数百nm)を基準として設計される場合が多く、決定したい位置精度とは1桁以上の開きがある。そこで、我々はポリスチレンビーズの位置決定を用いて、蛍光顕微鏡の機械的安定性を $\pm 0.1 \text{ nm}$ の精度で定量的に決定できる光学系を作製した。その結果、温度1.5 Kの1分子蛍光顕微鏡の機械的ゆれが、15分にわたり $\pm 1 \text{ nm}$ に抑制できることを実験的に確かめたので紹介する。

## 経過と考察

図2Aに、作製した光学系を示す。超流動ヘリウム恒温槽はこれまで数ケルビンのタンパク質1分子分光に用いてきたものである[1,2,10]。これは、文献5,6で用いたものとほぼ同一の設計で制作したものであり、機械的な安定性も同程度であると考えられる。試料と対物レンズ(反射型、焦点距離 $f = 2 \text{ mm}$ [11]、 $NA = 0.53$ )は超流動ヘリウム中に配置した。試料には、直径100 nmのポリスチレンビーズをスピコートしたガラス基板を用いた。コートの際に、面密度を $10^3 \mu\text{m}^{-2}$ に調整することで、個々のビーズの画像を分離して観測出来る条件にした。試料の後方からレーザー光( $\lambda = 633 \text{ nm}$ )を集光し、ビーズからの散乱光を対物レンズで集め、 $f = 200 \text{ mm}$ の結像レンズでCMOSカメラ(ARTCAM-130MI-BW、フレームレート: $> 15 \text{ fps}$ 、画素サイズ: $5.2 \mu\text{m} \times 5.2 \mu\text{m}$ )に結像させた。この結像レンズとCMOSカメラはアルミで一体成形したホルダーに固定し、特に、CMOSカメラはエポキシ樹脂で接着することで、結像レンズとCMOSカメラの相対位置の変化を $\pm 10 \text{ nm}$ に抑えた。図2Aの光学系は倍率100倍の光学顕微鏡になっている。このため、結像レンズとCMOS

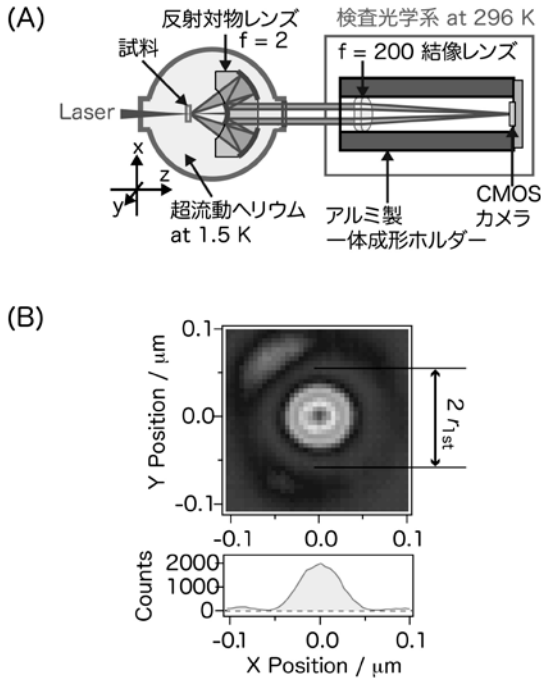


図2. 検査に用いた光学系。(A) 1.5 Kの光学顕微鏡の機械的安定性を検査するための光学配置。x軸は定盤に対して水平方向、y軸は鉛直方向とする。(B) CMOSカメラで観測されたビーズの散乱像。カメラの機械的ドリフトが $\pm 10$  nmであれば、試料位置での機械安定性の検査精度が $\pm 0.1$  nmとなる。

図2Bに、図2Aの顕微鏡で得られたビーズの光散乱イメージを示す。原点にあるのが、1個のビーズからの散乱光である。図2Aのような配置では、ビーズで散乱されたレーザー光は反射対物レンズの小さい球面鏡で遮蔽されるために観測されない。このため、得られる散乱像は図2Bのような暗視野の画像となる[10]。解析では、直径 $2r_{1st} = 0.11$   $\mu\text{m}$ の円（第一暗環）の中の信号のみを用いて1次のモーメントを求め、これをビーズ散乱像の位置 $(x, y)$ とした。試料基板とビーズとの相対位置は数ケルビン下であるため、固定されている。よって、光学系で検出されるビーズ散乱像の動きは、試料と対物レンズとの相対位置の変化によるものと考えられる。

低温での光学顕微鏡の検査を行う前に、検査光学系図2A、緑の枠内の安定度を定量的に検査した。検査には、理想的な平面波が必要である。そこで、検査光学系のデザインを元にした光源を作製した（図3A、赤の枠内）。この光源は直径 $10$   $\mu\text{m}$ ピンホールとコリメータレンズからなり、検査光学系との違いは、CMOSカメラがピンホールになっただけである。ピンホールはカメラより安定に保持できるので、その機械的安定度は、検査光学系と比べて、同程度以上である。さらに、直径 $10$   $\mu\text{m}$ ピンホールに対して、十分に大きいスポット径 $600$   $\mu\text{m}$ のレーザ

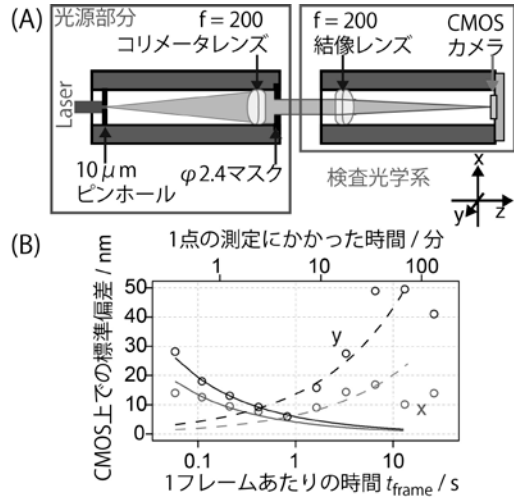


図3. 高精度位置決定装置。(A) 検査光学系の安定性を検査するための光学配置と(B) その検査結果。1点あたり300回の測定をおこない、その標準偏差を $t_{\text{frame}}$ に対してプロットした。実線で $1/\sqrt{t_{\text{frame}}}$ 、破線で $\sqrt{t_{\text{frame}}}$ の曲線をしめす。

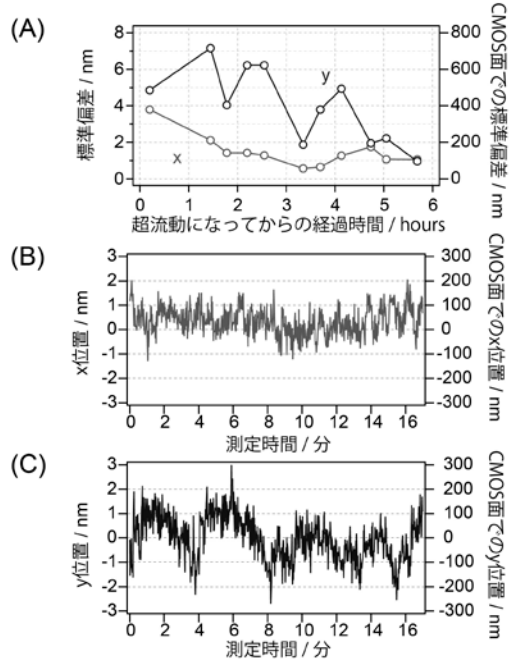


図4. (A) 温度1.5 Kにおける基板と対物レンズとの相対位置の標準偏差。 $t_{\text{frame}} = 1.5$ 秒で850回の測定をおこない、その標準偏差をプロットした。(B, C) 最も安定した時間(5.7時間後)の実測値。右の縦軸がCMOS画面上で観測されたビーズの動きであり、左の縦軸は倍率 $M = 100$ を割り算して求めた対物レンズと試料との相対位置の変化。

$\lambda = 633$  nm)を入射することで、レーザーのビーム位置安定性が検査に影響しないようにしている。

検査結果を図3Bに示す。1点あたり300回の測定をおこない、その標準変化を1フレームあたりの時間 $t_{\text{frame}}$ に対してプロットした。図中の最小の $t_{\text{frame}} = 0.06$ 秒でも、 $r_{1st} (= 0.05$   $\mu\text{m})$ に比べて3桁高い精度で位置を決定できる。さらに、 $t_{\text{frame}}$ を1秒まで長くしていくと、CMOS上での標準偏差は、時間の平方根に反比例して減少し、最終的に $\pm 10$  nmになった。これは、 $t_{\text{frame}} < 1$ 秒では、偏差の主な要因が光子数ゆ

らぎによることを意味している。一方、 $t_{\text{frame}} > 1$  秒では、偏差は時間と共に増加した。長時間の領域に、あらわれる偏差は設置する定盤の剛性を向上させると減少するため、主に、定盤の歪みに由来すると考えられる。図 3B の結果から、以下の検査は  $t_{\text{frame}} = 1.5$  秒で行うことにした。この場合、CMOS 面でのビーズ散乱像の位置の標準偏差は $\pm 10$  nm であり、試料面では $\pm 0.1$  nm の精度になる。

図 4A に、図 2A の光学系を用いて測定した対物レンズと試料との機械的ゆれの結果を示す。右の縦軸は CMOS 面で検出されるビーズ散乱像の位置の標準偏差であり (図 3B の縦軸と同じ物理量)、これから見積もった対物レンズと試料との相対位置の変化の標準偏差を左の縦軸に示す。図の横軸の原点はヘリウムが超流動状態になった時である。定盤に対して、水平、鉛直方向 (x, y 軸) 共に、ヘリウムが超流動状態になってから数時間で機械的安定性が増加していき、5.7 時間後に $\pm 1$  nm に到達した。この条件であれば、文献 5, 6 の数 nm の位置決定は十分に実行可能である。

最高の性能となった 5.7 時間後における、基板と対物レンズとの相対位置の時間変化を図 4B, C に示す。図から、y 軸は x 軸に比べて、約 4 分間隔の数 nm の揺れがある。この周期は部屋のエアコンの ON OFF の周期と一致しており、部屋の温度変化により恒温槽に歪みが生じたためと考えている。

## 参考文献

1. S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, M. Matsushita; *Phys. Rev. Lett.* **100**, 168101 (2008).
2. S. Fujiyoshi, M. Hirano, M. Matsushita, M. Iseki, M. Watanabe; *Phys. Rev. Lett.* **106**, 078101 (2011).
3. 稲川 博敬・松下 道雄・藤芳 暁; 「限界性能を持つ反射対物レンズの開発と数 K での色素 1 分子イメージングへの応用」分子科学討論会 2013、3P087、2013 年 9 月 26 日.
4. Bobroff; *Rev. Sci. Instrum.*, **57**, 1152 - 1157 (1986).
5. T. Schmidt, G.J. Schütz, W. Baumgartner, H.J. Gruber, H. Schindler; *J. Phys. Chem.*, **99**, 17662 - 17668 (1995).
6. A. Pertsinidis, Y. Zhang, S. Chu; *Nature*, **466**, 647-651 (2010).
7. M.J. Rust, M. Bates, X. Zhuang; *Nature Methods*, **3**, 793 (2006).

8. M. Matsushita, A. Bloëß, Y. Durand, J.Y.P. Butter, J. Schmidt, E.J.J. Groenen; *J. Chem. Phys.*, **117**, 3383 - 3390 (2002).
9. A. Bloëß, Y. Durand, M. Matsushita, H. van der Meer, G.J. Brakenhoff, J. Schmidt; *J. Microscopy*; **205**, 76 - 85 (2002).
10. S. Fujiyoshi, Y. Furuya, M. Iseki, M. Watanabe, M. Matsushita; *J. Phys. Chem. Lett.*; **1**, 2541 - 2545 (2010).
11. M. Fujiwara, S. Fujiyoshi, M. Matsushita; *J. Opt. Soc. Am. B*, **26**, 1395 - 1399 (2009).

## 研究の発表

### 学会発表

1. 藤芳暁・大友康平・古屋陽・出羽毅久・南後守・伊関峰生・渡辺正勝・松下道雄; 「タンパク質 1 分子の中赤外分光」第 39 回生体分子科学討論会 2012、2012 年 6 月 9 日
2. S. Fujiyoshi; 「Observation of vibrational absorption of single protein at a few kelvins」第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月 23 日
3. 稲川博敬・丸尾美奈子・松下道雄・藤芳暁; 「温度数 K における一分子分光のための高開口数対物レンズの開発」分子科学討論会 2012、2P020、2012 年 9 月 19 日
4. 稲川博敬・丸尾美奈子・松下道雄・藤芳暁; 「開口数 0.8 の極低温用対物レンズ：一分子蛍光観察による評価」日本物理学会年会、20pFJ-12、2012 年 9 月 20 日
5. 丸尾美奈子・稲川博敬・松下道雄・藤芳暁; 「温度数 K における色素 1 分子の 3 次元イメージング」日本物理学会年会、2012 年 3 月 27 日.
6. 稲川 博敬・松下 道雄・藤芳 暁; 「限界性能を持つ反射対物レンズの開発と数 K での色素 1 分子イメージングへの応用」分子科学討論会 2013、3P087、2013 年 9 月 26 日.
7. 虎谷泰靖・丸尾美奈子・稲川 博敬・喜井勲・林宣弘・細谷孝充・松下 道雄・藤芳 暁; 「温度数 K の色素分子の三次元イメージング技術の設計と実現」分子科学討論会 2013、3P088、2013 年 9 月 26 日.
8. 若尾佳祐・濱田裕紀・日野原拓也・松下 道雄・藤芳 暁; 「温度 1.5 K のたんぱく質 1 分子イメージング装置の機械的安定性の評価と向上」分子科学討論会 2013、3P089、2013 年 9 月 26 日.

9.

誌上発表

1. T. Hinohara, Y.I. Hamada, I. Nakamura, M. Matsushita, S. Fujiyoshi; *Chem. Phys.*, **419**, 246-249 (2010).