

# 研 究 報 告 書

## 「細胞内部を覗く分子解像度の三次元蛍光顕微鏡」

研究タイプ：通常型

研究期間：平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研 究 者：藤 芳 暁

### 1. 研究のねらい

細胞で起こる生命活動には無数の生体分子が関わっている。これらの分子は互いに相互作用することで三次元的な構造体を形成している。しかも、細胞周期や外部刺激に応じて、巧みにその集合状態を変化させることで多彩な機能を発現している。ところが、その変化が速い上、相互作用が弱い分子は自由に拡散しているため、細胞全体を分子レベルで可視化することは現在、不可能である。このため、生命活動には多くの謎が残されている。当該課題では、試料を急速冷凍し分子の動きを完全に固定することで、細胞全体を分子解像度（三次元解像度 2 nm）で観察できる蛍光顕微鏡を世界にさきがけて開発する。分子解像度を実現することで、細胞で多彩な機能を発現させている生体分子同士の三次元的なネットワークを 1 分子ごとに観察できる技術を開発する。

### 2. 研究成果

#### （1）概要

私は「細胞内部を覗く分子解像度の三次元蛍光顕微鏡」という課題の元、高空間分解能で 1 分子を観察できるクライオ蛍光顕微鏡を開発してきた。顕微鏡の解像度を分子レベルに上げていくと言うことは、つまり 1 分子ごとにその位置を決定することを意味する。ここが、分子解像度を実現する最大の課題である。1 分子からの信号は微弱であり、我々の見積りでは 1 分子あたり数分の時間が必要になる。ところが、細胞内部で生体分子は高速に移動しており、1 分子の位置を決定している間にも状態が変化してしまう。そこで、我々は試料を急速冷凍し、ガラス状態になった水の中に生体分子を閉じ込める「クライオ固定化」を用いて、生体分子一つ一つの三次元位置を分子レベルで決定することに挑戦している。本さきがけの研究では、低温観察に用いる蛍光顕微鏡と色素プローブ開発という実験に最も重要な部分に取り組み、これに成功した[論文発表 1, 2]。

低温試料を観察するための蛍光顕微鏡（クライオ蛍光顕微鏡）には市販品はあるものの、当該課題を実行できるような機械的安定性を持つ顕微鏡はない。しかも、高精度な三次元観察をおこなうためには、顕微鏡の光学性能を限界まで引き上げる必要がある。そこで、我々は既存品をはるかに凌駕する高イメージ安定性（0.05 nm）と高光学性能（開口数 NA = 0.99）を併せ持つクライオ蛍光顕微鏡を独自開発した。このイメージ安定性と光学性能を同時に向上させる鍵となったのが、低温で回折限界の性能を発揮する対物レンズ、クライオ対物鏡である。

クライオ蛍光顕微鏡のイメージ安定性に重要なのは、対物レンズと試料の相対位置の安定化である。当該課題よりも以前に、我々はイメージ安定性を確保するには、試料と対物レンズを剛性の高いホルダーに組み込み、同一の環境に設置することが効果的である

ことを明らかにしている。この場合、クライオ蛍光顕微鏡では試料を数ケルビンに冷却するので、対物レンズも数ケルビンに冷却しなければならない。しかし、私が知る限り、低温下で回折限界の性能を持ち、高い開口数の対物レンズは市販されていない。そこで、我々は当該研究以前から開発してきたクライオ対物鏡の高開口数化およびこれを用いたクライオ蛍光顕微鏡を独自開発した。その結果、昨年、色素一分子の三次元位置を分子解像度で観察することに世界ではじめて成功した。

## (2) 詳細

### 課題 A クライオ蛍光顕微鏡の製作

図 1 は、開発したクライオ蛍光顕微鏡の本体部分の写真である。機械的な安定性必要な光学素子は厚さ 25 mm のステンレス製のベースプレート上に、同じくステンレス製の壁を設置し、この壁に直接光学素子を設置することで極めて高い機械的安定性を確保した。たとえば、図中の矢印の箱がその安定化光学系ユニットである。さらに、低温槽内でクライオ対物鏡と試料を固定するインサートヘッドの材料をチタンに統一することで、低温槽内部の機械的安定性も極限まで高めている。図 2 はその写真である。手前に見えるのが稲川鏡。上側に見えるのが位置安定化に用いるセンサーである。その結果、クライオ蛍光顕微鏡としてのイメージ安定性が標準偏差で 0.05 nm という本課題に十分な安定性を得ることに成功した。さらに、本課題に



図 1. 開発したクライオ蛍光顕微鏡。

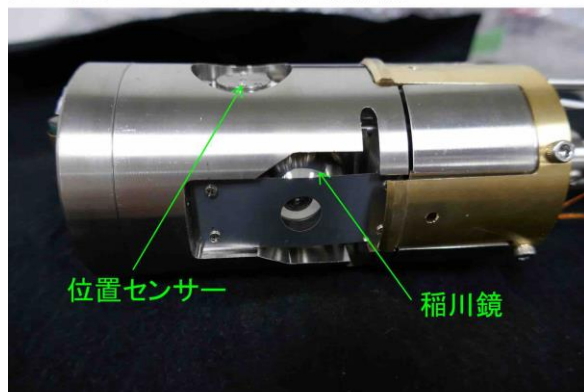


図 2. 総チタン製の対物鏡 - 試料ホルダー。

用いたクライオ対物鏡である稲川鏡は開口数が 0.99 と極限ながら、低温から室温までのあらゆる温度で使用できるという世界的にも唯一の特長を持っており、学術的な価値も高いと考えられる。

### 課題 B 色素 1 分子の分子解像度の三次元位置決定

図 3a は蛍光タンパク質のサイズと位置決定精度の関係を表している。図中のリボンで表示されているのが、蛍光タンパク質 GFP の三次元構造である。これに対して、白い丸が標準誤差 1 nm に対応する半径 2 nm の円である。白い丸はちょうど GFP のサイズと同等であり、標準誤差 1 nm が分子解像度と言える。

図 3b から 3d が分子レベルの三次元位置決定の実験結果である。ターゲット分子は Atto647N であり、一つの Atto647N 分子からの蛍光である。xy 方向の測定には、焦平面 ( $z = 0$  nm) における蛍光画像を測定する (図 3b)。図のように、光のスポットの直径は

約 500 nm であるが、その重心を求めるとスポット径よりもはるかに高い精度で  $xy$  方向の位置を決定できる。 $z$  方向の測定は、焦点から少しずれた位置 ( $z = -750$  nm) で蛍光画像を測定する (図 3c)。このような配置で測定を行うと、画像のぼけ具合 (スポットの幅  $S_{xy}$ ) から色素の  $z$  の位置を決定できる。実際の測定では  $S_{xy}$  の情報だけを正確に抜き出し、かつ光検出器の読み出しノイズを減らすために、画素数を下げて測定している。図 3d は同じ分子に対して 18 回位置決定した結果である。標準誤差は  $xy$  方向で 0.2 nm、 $z$  方向で 0.9 nm であった。図 3a の蛍光タンパク質の大きさと比較すると、得られた位置決定精度は分子レベルになっていることが分かる。

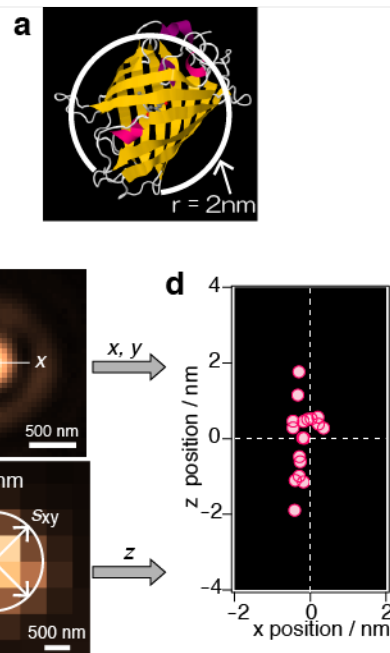


図 3. (a) 分子レベルの位置精度とは、蛍光タンパク質 [PDB code: 3EMA] のサイズと精度との比較。色素 1 分子の三次元位置決定の原理。(b) 焦点位置での 1 分子色素の蛍光画像。(c) 焦点から少しずれた位置での色素の蛍光画像。(d) b と c の二つの画像から求めた色素の三次元位置。

#### 課題 C クライオ蛍光イメージングのための近赤外発光性色素の探究

課題 B のように、一つの色素の位置決定には成功した。しかし、細胞内画像化を考えると、乗り越えなければならない課題が二つある。それは、(1) 図 3b のような有限のスポット内にある色素をいかに見分けるかということと (2) 細胞内物質の自家蛍光をさけるかという二つである。この両方を満たす蛍光プローブとしてフェルスター共鳴励起移動を用いた近赤外発光性色素を東大神谷先生 (同さきがけ一期生) のグループに合成してもらい、低温での評価をおこなった。その結果、温度 2 K における超解像画像の取得に成功した。

### 3. 今後の展開

光は細胞や組織のような厚みのある試料に対してユニークな長所を持っている。このため、私は、もし細胞内部の分子レベルイメージングが実現するとすれば、光学顕微鏡によってであると確信している。(電子顕微鏡やプローブ顕微鏡では、原理的にイメージングは不可能である。) しかし、解像度に大きな弱点を持っており、細胞内部を分子レベルで観察できていない。本課題では、その最大の弱点を克服するための大きな技術革新になると考えている。もちろん、同時に課題も明らかになってきており、これを乗り越えられれば生命現象の可視化が実現する。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

細胞内観察以外は、予定よりも高いレベルで実行できたと考えている。さらに、申請時には考えていなかったアイデアが当該研究期間内に浮かび、浜地統括のご理解の元、実行に移せたのが大変大きかった。これらの種は数年後には大樹となると考えている。

・ 研究の進め方（研究実施体制及び研究費執行状況）

浜地総括やさきがけ事務局の方々の支援により、大変スムーズに効果的に予算執行が出来たと考えている。

・ 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果（今後の見込みを含む）

蛍光顕微鏡は細胞内分子レベルイメージングを達成できる唯一の方法であると考えている。この蛍光顕微鏡の最大の弱点である解像度を改善したことは非常に大きかったと考えている。近い将来、生命現象を可視化することで、生命の謎を解き明かしていき、健康な社会の実現に貢献できるはずである。

・ その他

投稿論文は二報と少ないものの、共に責任著者として執筆している。さらに、当該研究に関係する論文および特許の執筆が多数残っており、最終的には十分な成果報告が出来ると考えられる。

(2) 研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

(研究総括)

生体分子の位置を分子レベルの分解能で決定するクライオ蛍光顕微鏡の開発という挑戦的な課題に取り組みました。試料と対物レンズをチタン製の剛性の高いホルダーに組み込み、これらを全て液体ヘリウム中に浸漬するという独創的である意味野蛮なアイデアで、数ケルビンでの冷却、イメージングの高い安定性を達成しました。また、この極低温下でも回折限界の性能を持ち高開口度数を実現する対物鏡の開発を成し遂げ、これらの技術を用いて、色素1分子の三次元位置を分子解像度で観察することに世界で初めて成功しました。これは十分に尖った、最先端の成果であると評価できます。加えて、クライオ蛍光イメージングのための近赤外発光色素の探求を、本さきがけ領域内の神谷研究者との共同研究により、また、複数の生体分子の相対位置を決定する技術の開発を同じくさきがけ1細胞解析領域内の榎田研究者と進めるなど、領域内の研究者との共同研究を積極的に進めることによって優れた成果を上げています。

今後は、本課題で獲得した技術を、モデル分子のイメージングから、細胞内部の分子の超解像クライオイメージングの実現に発展させてゆくことを期待します。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文（原著論文）発表

1. 稲川博敬、虎谷泰靖、本橋和也、中村一平、松下道雄、藤芳 暁. Reflecting microscope system with a 0.99 numerical aperture designed for three-dimensional fluorescence imaging of individual molecules at cryogenic temperatures. Scientific Reports. 2015, 5, 12833.
2. 古林琢、本橋和也、若尾圭祐、松田剛、喜井勲、細谷孝充、林宣宏、定家真人、石川冬木、松下道雄、藤芳 暁. Three-Dimensional Localization of an Individual Fluorescent Molecule with Angstrom Precision. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139, 8990 - 8994.

(2) 特許出願

研究期間累積件数 : 0 件

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 藤芳 暁 クライオ蛍光顕微鏡で見る数ケルビンの世界  
バイオイメーキング学会 (24 回)・東京 2015 年 9 月 28 日
2. 本橋和也、古林琢、若尾佳祐、松下道雄、石川冬木、喜井勲、藤芳暁 クライオ 1 分子  
蛍光イメージングによる高精度三次元位置決定 分子科学討論・神戸 2016 年 9 月 14 日
3. 藤芳暁 蛍光で 1 分子を見る 日本生物物理学会・筑波 (招待講演) 2016 年 11 月 26 日
4. 資延啓, 田邊大明, 藤芳暁, 松下道雄 スペクトル選択クライオ超解像顕微法のため  
の色素の探索 日本物理学会・大阪 2017 年 3 月 17 日
5. 松田 剛, 古林 琢, 藤芳 暁, 松下 道雄 1 分子の 3 次元位置をショットノイズ限界  
で測定可能な 顕微法の光学シミュレーション 日本物理学会・盛岡  
2017 年 9 月 22 日
6. 古林琢, 松下道雄, 藤芳暁 クライオ 1 分子蛍光顕微鏡の高精度化に向けた技術開発  
日本物理学会・盛岡 2017 年 9 月 22 日

プレスリリース

日経産業新聞 2017/7/5、日刊工業新聞 2017/7/5、科学新聞 2017/7/14