

はかる 第6回

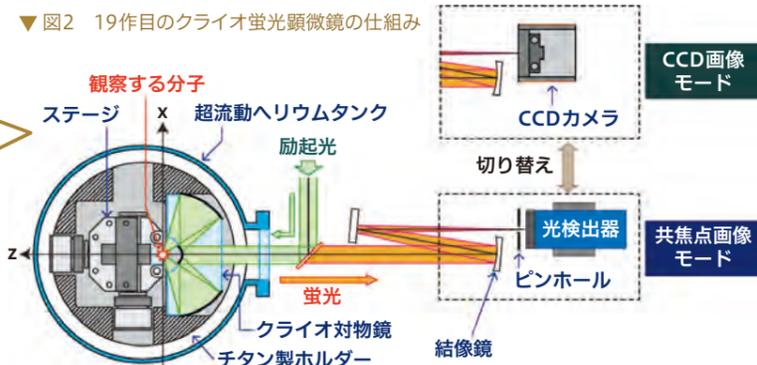
世界一高精度な光学顕微鏡で細胞の内部を見たい

細胞は多数の分子できているが、細胞の成り立ちや生理機能を分子レベルで画像化した人はいない。この前人未達の撮影に挑戦しているのが東京工業大学理学院物理学系の藤芳暁助教たちである。その足がかりとして、生体分子の3次元位置を1分子ずつ1ナノメートル(10億分の1メートル)精度で観察できるクライオ蛍光顕微鏡が完成した。その基本的な仕組みと足掛け14年に及ぶ開発の足跡を紹介しよう。

ふじよしさとる
藤芳暁 東京工業大学 理学院物理学系 助教

総合研究大学院大学数物科学研究科博士課程修了。神奈川県科学技術アカデミーなどを経て2004年から現職。

▼ 図2 19作目のクライオ蛍光顕微鏡の仕組み



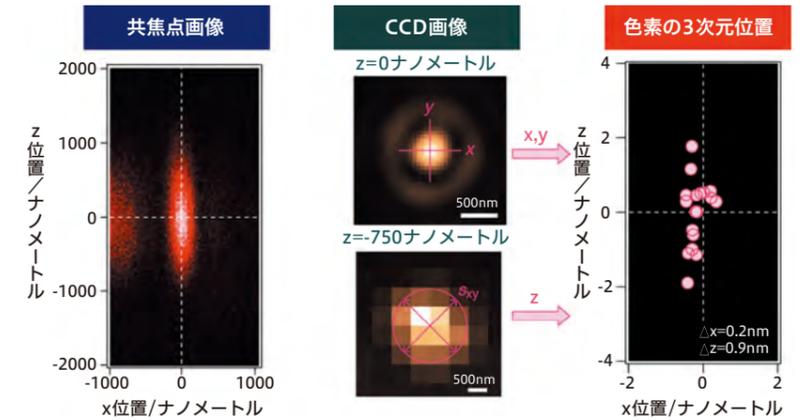
▲ 図1 クライオ対物鏡と試料をセットする一体成形のチタン製ホルダー(左)とホルダーを超流動ヘリウムタンクに入れて作業しているのはこの顕微鏡の製作者で大学院生の古林琢さん。



◀ 図3 クライオ対物鏡(8代目)。外側にドーナツ状の凹面鏡があり、真上からのぞくと内部にも小さい凹面鏡がある。



▲ 図4 超流動ヘリウムタンクの外側にある顕微鏡本体部分。図2には省略されているが、光検出の部分にも高精度測定を支える重要な技術が詰まっている。



▲ 図5 色素1分子の3次元位置決定の手順。まず試料全体の共焦点画像(左)を取得する。次に、深さz方向の位置が異なる2つのCCD画像を撮影し、スポットの重心(中央・上)およびスポットの幅Sxy(中央・下)から色素1分子の3次元位置(右)を高精度に決定する。nm: ナノメートル

さんたちは2枚の鏡を組み合わせた対物鏡に目をつけた。対物鏡の設計は2枚の鏡だけで済むため、研究と教育を同時に行う大学の研究対象には最適だと考えたからだ。

まず取り組んだのが極低温に耐える工夫だ。鏡を細いワイヤーでつり下げた従来の対物鏡は、極低温下ではワイヤーが変形して位置がずれてしまう。そこで、修士課程の学生だった藤原正規さん、金昌萬さんと、2つの鏡の間を熱による形状や体積の変化が小さい石英ガラスで埋めるデザインのクライオ対物鏡を2007年に開発した。作製は困難を極めたが、高い研磨技術を持つ職人に支えられた。「日本の技術は世界に誇るべきものです。基礎研究の仕事はリスクが高く、さほど利益にもなりません、研究の価値を訴え、共感を得られたことが成果につながりました」と藤芳さんはこれまでの道のりを振り返る。

この頃のクライオ対物鏡は光軸(z)方向の分解能が低く、3次元画像化の大きな障害になっていた。そこで、非球面鏡を採用し、考え得る最高レベルの光学性能を持つクライオ対物鏡(図3)を修士学生の稲川博敬さんと2011年に開発した。

2014年には、さきがけ研究課題に採択され研究が加速した。特に、机上の空論と諦めていたチタン製ホルダー(図1)の製作に取りかかれたことが大きかったという。こうして「世界一揺れない光学顕微鏡(図2、4)」の開発に成功し、「最新のクライオ対物鏡」と組み合わせることで、色素1分子の3次元位置を1ナノメートルの精度で決定することに成功した。

3次元位置の決定法

クライオ蛍光顕微鏡を用いて色素1分子の3次元位置を決定する原理を説明しよう。顕微鏡の概略図を図2に、写真を図4に示す。超流動ヘリウム中で冷却されている試料とクライオ対物鏡に色素を励起するための光を照射し、クライオ対物鏡で色素へ集光する。色素から発せられた蛍光を同じクライオ対物鏡で集めて、結像鏡でピンホールに集光し、通過した光子の数を測定する共焦点モードで(図2)、試料全体の3次元画像を得る(図5左)。この共焦点モードでは、この測定に特有の明滅現象による雑音が大きくなり、1分子レベルの精度は得られないが、試料の全体像を捉えることができる。

次に、ピンホールと光検出器をCCDカメラに切り替える(CCD画像モード)。そうすると、雑音が消え、鮮明な画像が得られ、より高精度に3次元位置を決定できる。まず共焦点画像モードで決まった焦点近傍(z=0ナノメートル)で撮影すると、画像(図5中央・上)から色素分子のxy位置を高精度に求められる。次に焦点からz軸方向に少し離れた位置(z=750ナノメートル)で撮影する(図5中央・下)。ここで、あえて画素数を下げて、画像のぼけ具合(スポットの幅Sxy)の情報だけを取り出し、Sxyから深さzを精度良く算出できるように工夫した。こうして得られた色素1分子の3次元位置を点描する。同じ色素を18回測定した結果が、図5右の3次元画像である。元の共焦点画像(図5左)ではz軸座標の1目盛りが1,000ナノメートルだったのに対し、図5右の画像では1目盛りが2ナノメートルと500分の1まで細かくなっている。分子レベルの精度の達成は、古林琢さん、本橋和也さん、若尾佳祐さんの修士課程での研究成果だ。

生命現象を分子レベルで画像化する

藤芳さんの夢は、生命現象を分子レベルで画像化することだ。「細胞内では、複数の分子が複雑に作用して機能します。生命現象の解明には、これらの分子がなぜ、どのように相互作用しているのかを知る必要があります。そのためには、生体内で個々の分子の3次元位置を正確に特定することが重要です」。

どのような分子に色素分子を付ければ目的の生命現象が観測できるのかなど、さらなる研究を進める藤芳さん。クライオ蛍光顕微鏡による未知の生命現象解明に向け、期待は膨らむ。

クライオ電子顕微鏡のノーベル化学賞受賞に寄せて

JSTから届いたこの原稿の確認中に、「水中にある生体分子の高分解能構造決定のためのクライオ電子顕微鏡の開発」が今年のノーベル化学賞に選ばれたと知った。顕微鏡開発を続けている私たちにあって、これほど勇気づけられるニュースはない。蛍光顕微鏡は細胞内部まで見渡せ、かつ1分子の感度があるという、ほかの顕微鏡にはない特徴を持つ。分解能ではクライオ電子顕微鏡にはかないが及ばなかったが、ついに今年、クライオ蛍光顕微鏡の分解能も分子レベルに達した。今後にご期待いただきたい。

1分子レベルの精度を持つクライオ蛍光顕微鏡

蛍光顕微鏡は光学顕微鏡の一種で、標的の生体分子に色素分子などの蛍光標識を付け、可視光を当てて試料が発する蛍光を観察する。可視光は細胞の厚みを透過するので、細胞の切片化が必要な電子顕微鏡と違い、細胞内全体を観測できる。また、1分子を検知できる感度を持つため、集合体の全体構造や複数の分子の3次元での位置関係が特定できる。生命現象の理解に適しており、生命科学の分野では広く日常的に使われてきた。ただし、その分解能には原理的な限界があり、どんなに高倍率の顕微鏡を用意しても、蛍光波長(例えば、緑色は約500ナノメートル)の半分より近接した分子の位置を見分けることはできず、1~10ナノメートルの生体分子を観測するためには解像度が2桁足りない。

この限界を超えるウルトラ顕微鏡は1902年に実現した。さらに、この発展型である超解像蛍光顕微鏡を1999年にシュテファン・ヘル博士らが実証した。その生体試料への応用が評価され、2014年にはヘル博士、エリック・ベツィグ博士、ウィリアム・モーナー博士がノーベル化学賞を受賞した。しかし、その解像度は約20ナノメートルであり、藤芳さんたちが求める分子レベル、1ナノメートルの精度にはまだ足りない。

解像度が上がらない主な原因は、超解像顕微鏡は撮影時間が長く、標的分子や顕微鏡本体の熱運動によって画像がぼやけてしまうことだ。藤芳さんたちは試料を極低温で凍結して標的分子の熱運動を止める「クライオ(低温、冷却)固定法」を追

求し、2004年以降、実に19台のクライオ蛍光顕微鏡を自作してきた。この間、藤芳さんと一緒に研究した学生は1人1台以上の顕微鏡を作ってきた計算だ。今年6月には、世界で初めて色素1分子の3次元位置をナノメートルの精度で決定することに成功した。以下に、これまでの取り組みを紹介する。

世界一「揺れない」光学顕微鏡の秘訣

試料を極低温に冷却すれば、分子の熱運動は止まる。一方、光学顕微鏡の安定化には、試料と対物レンズの相対位置の固定が大切である。これを最も高いレベルで実現するのは、対物レンズを試料の直近に配置し、同じ環境(つまり極低温)下に置く配置である。そこで、剛性が高く低温特性に優れた一体成形のチタン製ホルダー(図1)と、次に示す極低温下でも動作するクライオ対物鏡(図3)を独自に開発した。そして、これらを一体化してセ氏マイナス271度の超流動ヘリウムに浸し冷却するクライオ蛍光顕微鏡により、カメラの手ふれにあたる画像揺れを0.05ナノメートルに抑えることに成功したのだ。

ここで用いる対物レンズには対物鏡型を採用した。顕微鏡の誕生から現在に至るまで、対物レンズの主流は複数のレンズを組み合わせた組レンズ型であったが、10数枚というレンズを相手にしなければならず、その設計はハードルが高かった。藤芳