

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	クライオ遠視野顕微鏡による 蛍光体のナノメートル確度での相対位置決定
Title(English)	Cryogenic far-field localization microscopy of individual fluorophores with nanometer accuracy
著者(和文)	古林 琢
Author(English)	Taku Furubayashi
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11370号, 授与年月日:2020年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松下 道雄,笹本 智弘,佐藤 琢哉,納富 雅也,VACHA MARTIN
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11370号, Conferred date:2020/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

(博士課程)

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	古林 琢	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	松下 道雄	准教授	Martin Vacha	教授
	審査員	佐藤 琢哉	教授		
		納富 雅也	教授		
	笹本 智弘	教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

細胞内の非侵襲な観察には、遠視野蛍光顕微鏡が唯一の手段である。感度は1分子レベルにまで達しているが、その分解能は生体分子のサイズより2桁大きく、光の回折限界である数百 nm に制限されている。もし解像度がオングストロームレベルまで達すれば、細胞内の構造を一分子ずつのレベルで可視化できる。本論文の研究は、高安定なクライオ蛍光顕微鏡を開発し、オングストローム精度で位置決定できることを実証し、さらに、ナノメートル確度での DNA のイメージングが出来ることを示したものである。

“Cryogenic far-field localization microscopy of individual fluorophores with nanometer accuracy”と題された本論文は以下の4章から構成されている。

第1章 “Introduction” では本研究の動機・目的と、これまでの研究における細胞内分子観察の進展について述べられている。

第2章 “3D localization of individual fluorophores with angstrom precision” では、生体試料の標識に用いられている色素である ATTO647N 1分子の3次元位置をオングストロームの精度で位置決定したことが述べられている。申請者はイメージ安定性が0.05 nm という非常に高安定なクライオ蛍光顕微鏡を立ち上げた。本論文の蛍光顕微鏡について、2次元検出器である CCD カメラを使用している。焦平面方向(x,y)の位置決定では、CCD カメラで取得した蛍光画像の重心位置を求めることで、1分子の位置を高い精度で決定できる。1分子蛍光体の蛍光強度は、蛍光状態と無蛍光状態を行き来する明滅現象が起こる。CCD カメラは、2次元面の各ピクセルを同時に検出するため、明滅現象によるノイズを消すことが出来ると述べている。

光軸方向(z)の位置決定では、デフォーカスイメージングによって位置決定を行っている。デフォーカスイメージングには干渉縞が存在し、これが位置決定の妨げとなっていた。オンチップビニングによってこの干渉縞の成分を除去し光軸方向の位置決定を行った。申請者は以上の方法によって1.8 Kにおける1分子の ATTO647N の位置を、5分間の測定で 10^6 の光子数を集め、標準誤差 0.53 nm (x), 0.31 nm (y), 0.90 nm (z)の精度で決定したことを述べている。

第3章 “Nanometer accuracy of individual fluorophores” では、DNA の両端を染色した2つの蛍光体の位置を決定することにより、ナノメートル確度でのイメージングに成功したことが述べられている。本論文でいう「精度」と「確度」は異なるものを示している。「精度」は位置決定の再現性を表し、これは第2章にて1 nm 未満を達成していることが述べられている。そして、

生体分子のイメージングには相対位置の測定の正確さである「確度」が必要であると述べている。

ナノメートル確度の位置決定の実証に向けて、申請者は DNA の両端に近赤外と赤色の色素をそれぞれ染色したサンプルを用いた。DNA の長さは 10 nm になるように設計されていた。このサンプルの色素の位置を求めたとき、位置決定の精度は 1 nm であったが、距離測定の分布が 0 から 50 nm までとなった。これは系統誤差の存在を示しており、この原因が蛍光分子の遷移ダイポールの配向にあることを突き止めている。ダイポール輻射が非等方的であるために、xy 面上の蛍光画像の中心位置として求める色素の xy 方向の位置が、色素の配向と z 方向の位置に依存して変化していたのである。このことを、焦点付近の蛍光強度の三次元分布を実際に測定することで明らかにした。通常 z 方向の位置は画像の合焦位置として決定し、その z 位置での xy 画像から xy 位置を決定するが、焦点は z 方向に波長程度の広がりを持つ。このため、先の測定においては z 方向の位置決定の精度が 0.7 μm であった。これは 10 nm の距離を測定するには大きすぎたのである。

これを補正するため、色素の焦点の位置を 10 nm の精度で求めたと述べている。第 2 章での z 方向位置決定では焦点の位置を求めることが困難であるため、申請者は -900 nm から +900 nm まで 100 nm 間隔で xy 画像の測定を行った。各画像の蛍光画像幅をフーリエ変換によって求め、最も狭くなる場所を色素の焦点位置とし、z 方向の位置を求めた。このような 3 次元点像分布関数(3D-PSF)の取得による系統誤差の補正を行った結果、10 nm の長さの DNA を 10 ± 5 nm で求められたことを示している。これは 5 nm の確度でイメージングが行えることを意味する。

第 4 章 “Conclusion” では以上の結果をまとめている。

申請者はナノメートル確度の分子イメージングに向けて、独自に高安定なクライオ蛍光顕微鏡を構築した。このクライオ蛍光顕微鏡は 0.05 nm の安定性をもち、単一の蛍光色素の位置をオングストロームの精度で位置決定できることを示した。この顕微鏡によって単一蛍光分子のダイポール輻射によって系統誤差が存在することを実験的に確認した。これを補正し、クライオ蛍光顕微鏡によってナノメートル確度のイメージングが行えることを実証した。この内容は生物物理学において、細胞内部の未だ観測されていない生体分子の分子レベルイメージングに向けて、その観測の可能性を示し、重要な貢献を果たしている。よって、本論文は博士（理学）の学位論文に十分値すると認められる。