

Simple Dark-Field Microscopy with Nanometer Spatial Precision and Microsecond Temporal Resolution

Hiroshi Ueno, So Nishikawa, Ryota Iino, Kazuhito V. Tabata, Shouichi Sakakihara, Toshio Yanagida & Hiroyuki Noji

Biophysical journal, 2010, **98**, 2014-2023

上野博史¹、西川宗²、飯野亮太¹、田端和仁¹、榊原昇一¹、柳田敏雄²、野地博行¹

(¹大阪大・産研、²大阪大・院生命機能)

【研究の背景・目的】近年、蛍光分子やナノ～マイクロオーダーの微粒子を光学的なプローブとして用いる1分子計測の技術は目覚ましい進歩を示している。この1分子計測の進歩は、生体内で起こる微小な現象を高時間および高空間分解能で解明するのに役立っている。特に、生体内での物質輸送を担うミオシンやキネシンといったリニアモータータンパク質、 F_1 -ATPaseや細菌の鞭毛モーターに代表される回転モータータンパク質の化学-力学カップリング機構の研究にはこの技術はいまや必須のものとなっている。しかしながら、これまでナノメートルレベルの精度を保ったまま高時間分解能(マイクロ～ミリ秒)を実現するには複雑な計測システムが必要とされてきたためこの技術は高い技術をもった研究者と特定の分野に限られてしまっていた。シンプルでかつ高い時間分解能と空間分解能を実現できる計測システムは、様々な研究分野に応用が期待され非常に有用である。そこで本研究では、シンプルでかつ高い時間・空間分解能を実現するために、これまで蛍光イメージングに用いられてきた対物型エバネッセント照明の技術を用いた新しい暗視野計測システムを開発した。

【方法・結果】構築した計測システムの模式図を図1に示す。光学系は、従来の全反射蛍光顕微鏡に用いられているものと全く同じである。今回の新しいシステムは、通常、蛍光顕微鏡でダイクロイックミラーを置く位置に、中心部だけミラー処理していない特殊なミラー(perforated mirror)を配置するだけである。こうすることにより、入射光と全反射で戻ってきた反射光はミラー面にあたり検出器(ここではHi-speed camera)には入ってこないが、サンプル由来の散乱光はミラーの中心部分を通して検出器に入ることで暗視野像が検出される。通常暗視野顕微鏡は、暗視野コンデンサーを用いて照明光を対物レンズの反対側から導入するが、今回のシステムではこのコンデンサーが不要。これにより試料上部に装置を置くスペースができ様々な分野に応用できると期待できる。この暗視野計測システムの位置決定精度の測定結果を図2に示す。

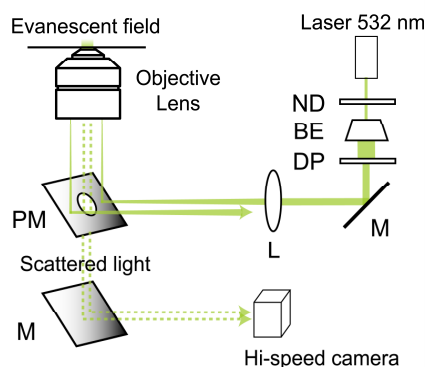


図 1 計測システムの模式図

略称は以下の通り。

ND (neutral density filter), BE (beam expander), DP (diaphragm), M (mirror), L (lens), PM (perforated mirror)

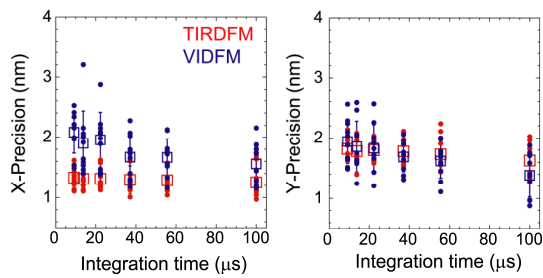


図 2 計測システムの精度の評価

TIRDFMと記した赤色のシンボルが今回構築した計測システムの精度結果。横軸がカメラの露光時間で時間分解能にあたる。縦軸は精度を示す。

精度はガラススライド上に固定した金コロイド(40nm)の暗視野像の重心位置の1秒間の標準偏差と定義した。結果、最高9.1 μ sの時間分解能でナノメートルレベルの空間分解能を示した。これは従来の暗視野顕微鏡と金粒子を用いた以前の値(0.32msで5–6nmの精度)と比べると大幅に改善していることがわかる。

さらにこの計測システムを回転分子モーターとして知られるF₁-ATPaseの測定に応用した結果を図3に示す。計測はプローブに金粒子を用いてF₁-ATPaseの回転を金粒子の回転として検出した。結果、9.1 μ sの時間分解能でF₁-ATPaseの回転検出に成功した。さらに、この高時間分解能の測定により回転中のF₁-ATPaseの角速度は一定にならないことが分かった。このことから、F₁-ATPaseが出すトルクには角度依存性があることが示唆された。

【結論・展望】最高9.1 μ sの時間分解能でナノメートルレベルの空間分解能を持つ非常にシンプルな暗視野顕微鏡システムの構築に成功した。この顕微鏡を用いて回転分子モーターであるF₁-ATPaseの回転を観察したところ、回転の際に角速度が一定にならないことが分かった。これは、F₁-ATPaseが出すトルクには角度依存性があることを示唆している。この高時間分解能と空間分解能を持つ計測システムは、エバネッセント照明の持つ有用性とそのシンプルさから、様々な計測に応用できることが期待される。

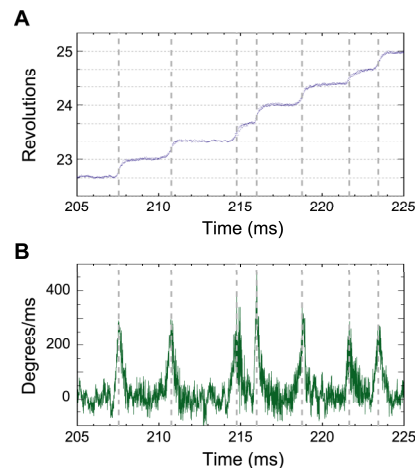


図 3 9.1 μ sの時間分解能におけるF₁-ATPaseの回転計測結果

Aは横軸を時間、縦軸を回転数としてプロットしたもの。加水分解待ちに相当するミリ秒オーダーの停止がわかる。BはAのデータを用いて時間に対して角速度をプロットしたもの。A、Bより回転中の角速度が一定でないことがわかる。