

論文の内容の要旨

論文題目

ピコメーター精度位置計測のためのレーザー暗視野顕微鏡法の開発とその応用

氏名 野田 直紀

生物物理学的な研究において、タンパク質をはじめとする生体分子、細胞小器官の動態や位置、それをもとにした変位を、ナノメートル、さらに、サブナノメートルの精度で計測することは、それらの機能と共役した構造変化のダイナミズム、粘弾性などの物理的性質を反映した熱揺らぎなどによる動態変化についての研究を行う上で、詳細な情報を得るための非常に重要な手法である。光学顕微鏡技術を用いた生体分子、細胞小器官の位置計測の側面から見ると、これまでに多種多様な指標（プローブ）、顕微鏡計測手法、位置計測デバイスを用いて研究が進められてきた。プローブとしては、マイクロビーズ、金コロイド粒子、量子ドット（Q-dot）、蛍光色素、蛍光たんぱく質などが挙げられる。また、顕微鏡技術を用いた計測手法としては、位相差顕微鏡法、微分干渉顕微鏡をもとにした手法、レーザー斜光照明法、FIONA、そして、対物レンズ後焦点面法（以下、Back Focal Plane 法から BFP 法）などがあげられる。位置計測デバイスとしては CCD カメラ、フォトダイオードがあげられる。より詳細な生体分子の動態変化を知るためのひとつの有力な手段として、より高い計測精度、より高い精密性を得ることが可能な手法を開発することが必須である。特に、既存の技術の 10~100 倍高い、サブナノメートルの位置精度、マイクロ秒オーダーの時間分解能を得ることができれば、生体分子のダイナミックな動態変化を特徴づける情報をリアルタイムで取得することが可能になり、それらの機能、物理的性質と結びついた原子スケールでの構造変化・揺らぎが解析可能となると期待される。

光学顕微鏡下で、計測対象の位置、それをもとにして変位を計測する際の位置計測精度には、Rayleigh や Abbe の分解能の定義は適用することができない。位置計測におい

て、計測精度が非常に大きく影響する因子は、シグナルとノイズの比 (S/N 比) である。すなわち、高い位置計測精度を得るためには、可能な限り低いノイズのもとで、被計測物体を可能な限り明るく照明して観察し、その位置を計測することが必要不可欠であるということの意味する。これらの要請を満たすためには、実際の計測において次の2つのアプローチの組み合わせによってのみ実現可能である。1つは可能な限り明るい照明光を用いること、2つ目は、試料の位置計測に寄与しない背景ノイズを可能な限り除去するということである。

本研究においては、ポリスチレンマイクロビーズを試料のプロブとして用いて位置計測実験を行った。これは蛍光プロブに対して明るい像を得ることができるためである。計測対照となる試料以外の背景ノイズを除去するために、暗視野照明光学系を用いた。一般的な暗視野照明光学系は、単純な光学系で構築されている。それは、照明光をコンデンサーレンズ、対物レンズの中心軸に対して斜め方向の大きい角度から導入し試料によって散乱された光のみを対物レンズでとりこみ、その像を観察するという照明法である。しかし、通常の暗視野照明光学系のひとつの短所は試料で散乱される散乱光が非常に弱いという点であり、高精度位置計測に必要な十分な散乱光を得ることができない。本研究では、レーザー光を光源とし、円錐形のレンズであるアキシコンレンズをそれに組み合わせることにより新しい光学系を開発し上記した問題点を解決した。このようにして完成させた“レーザー暗視野照明光学系”によって高い位置計測精度かつ高い時間分解能で位置計測を実現した。

アキシコンレンズは Chabrie、Maclead によって開発された円錐形のレンズである。アキシコンレンズによって生成される 0 次のベッセルビームが長焦点深度 (集光点ではなく集光ラインと呼ばれることもある) をもつことを利用し、微細構造技術、オプティカルトラップ、走査顕微鏡、外科手術用レーザーメスに用いられてきた。また、リング状の照明が可能であるという特性を生かし、エバネッセント照明にも用いられた。アキシコンレンズを用いた暗視野照明光学系については、守矢による特許が公開されアイデアとしては紹介されているが、高輝度観察像を得る利点は特に認識されておらず、位置計測の分野における具体的な実用化はなされていない。

本研究はアキシコンレンズを用いて暗視野照明光学系を構築した初めての研究であり、サブナノメートルの位置分解能、サブミリ秒の時間分解能で2次元の試料の高精度位置計測を可能にした。本論文では、光学系の構成、構築について詳しく述べ、この光学系によって得られる集光点の特性、また位置精度、時間分解能の評価についての結果、また光学系の応用例について詳しく述べる。