

# 単一高分子鎖のコンホメーション評価を実現する超解像光学顕微鏡の開発

(京大先端医工) 青木 裕之

ソフトマターの物性を理解する上で、個々の分子の振る舞いを直接的に実空間で観察することが可能となれば、有力な情報を与えるものと期待される。蛍光ラベル法はバルク内の単一分子観察を行う上で最も有効な手法であり、これまでに蛍光イメージングによる DNA 一分子についての研究が数多く報告されている。しかしながらポリスチレンなどの合成高分子は、そのサイズが 10–100 nm 程度であるため、回折限界によって空間分解能が 200 nm に制限された従来の蛍光顕微鏡で評価することは不可能であった。我々は新規な蛍光観察法を高分子の単一分子計測に適用することで、高分子鎖の振る舞いを直接評価することを目的としている。本発表では近年注目を集めている超解像光学技術による単一高分子鎖のコンホメーション高分解能評価について紹介する。

蛍光イメージングにおいては、観察対象に導入された蛍光分子からの蛍光を検出して顕微鏡観察を行うが、ここですべての蛍光分子を同時に画像素子に結像すると回折限界以下の距離情報は得られない。しかし視野内にただ一つの分子しか観察されなければ、その位置を数 nm の精度で決定できる。そのため観察対象をラベルしている複数の色素分子を一個ずつ逐次観察してゆくことで全分子の位置を高精度で決定し、その情報を元に画像再構築を行うことで高い分解能で光学像を得ることができる。このような顕微鏡法は Photo-Activated Localization Microscopy (PALM) と呼ばれる。図 1 にその測定法の概略を示す。PALM では試料を、蛍光体・非蛍光体の二つの異性体をとることのできるフォトクロミック色素によってラベルする。始めに試料に導入した全ての分子を非蛍光状態とした後、紫外光照射によってその中の一個のみを蛍光状態に活性化し、その蛍光顕微鏡画像 (C) から分子の位置を記録する (D)。観察された分子を非蛍光状態にした後に、再び紫外光を照射して別の分子を蛍光性として観察 (E)、その位置座標を得る (F)。これを全ての分子について繰り返すことで、高分解能の再構築画像を得ることができる (L)。その空間分解能は分子の位置決定精度によって決まるため、回折限界よりも一桁以上高い分解能を得ることができる。

試料としてポリブチルメタクリレート (PBMA) を用い、その側鎖のうち 0.8 % をフォトクロミック色素であるローダミンアミド誘導体によってラベルした ( $M_n = 2.2 \times 10^6$ )。これを蛍光ラベルしていない PBMA 中に分散して PALM による測定を行った。図 2 に示すように個々の PBMA 鎖が明瞭に観察されており、その空間分解能は 15 nm であった。

超解像光学顕微鏡は高分解能で単一高分子鎖の直接観察を可能にする新たな手法であり、分子レベルにおけるソフトマターの構造とダイナミクスを実験的に研究する上で有力な手段の一つとなるものと考えられる。

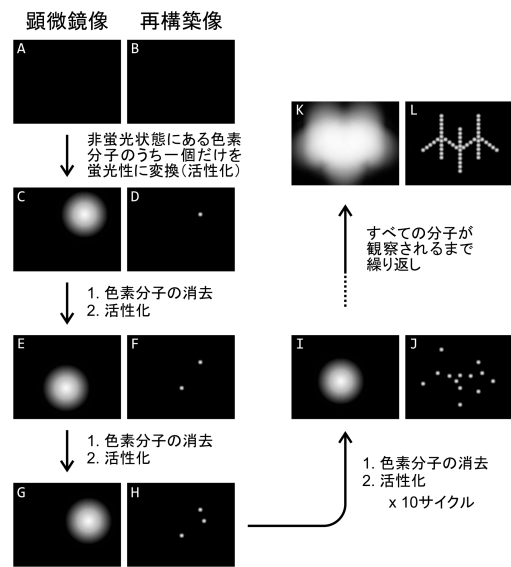


Figure 1. Schematic process of the PALM measurement.

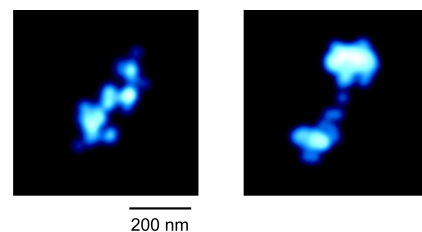


Figure 2. PALM images of single PBMA chains. The resolution of the reconstruction image is 15 nm.