

## 蛍光色素 1 分子イメージング

佐瀬 一郎<sup>1)</sup>

ICHIRO SASE

宮田 英威<sup>2)</sup>

HIDETAKE MIYATA

木下 一彦<sup>3)</sup>

KAZUHIKO KINOSITA

蛍光顕微鏡は、その感度の良さ、生きたままの試料の観察が可能である点などから医学、生理学、分子生物学など様々な分野の研究において用いられている。そして、いまやその蛍光顕微鏡下において、蛍光色素 1 分子のイメージングが可能となった。タンパク質や核酸分子 1 個に、じゃまにならないよう小さな目印をたったひとつ付けば、どこで何をしているのか見えるようになったのである。顕微鏡下で、タンパク質でできた「分子機械」が動き回るところ、また分子機械が互いに連絡・連携しながら働く現場を、1 分子レベルで観察し、そのメカニズムへ迫る新たな道が開かれたといえる。

1

### 検出からイメージングへ

蛍光染色された生体分子が観察領域内に存在したかどうか？そのような信号をとらえることが蛍光色素 1 分子観察の始まりであった。つまり、検出である。はじめは、たくさんの色素を結合したタンパク質分子<sup>1)</sup>や、多数の発光団を持つ巨大色素<sup>2,3)</sup>などが試料として用い

られていた。しかし、励起方法の改良などにより、1990 年には一般的な蛍光色素(ローダミン) 1 分子でも十分に検出可能であることが示された。<sup>4)</sup>

蛍光顕微鏡下で 1 分子を画像としてとらえることができれば、単なる検出にとどまらず位置情報(互いの位置関係を含む)を加えることができる。水溶液中の生体分子 1 分子をとらえようという試みは Hirschfeld(1976)による抗体分子のイメージングにはじまり、細胞表面レセプター、<sup>5)</sup> DNA<sup>6)</sup>などの動態の観察へと発展した。しかし、顕微鏡の場合もやはり、これら初期の実験は 1 分子に多数( $\sim 10^2$ )の蛍光色素を結合したものであった。強い蛍光を得ようとするためである。しかし、多数の蛍光色素を結合することのできる分子は限定され、一般的には多数の蛍光色素を結合することによるタンパク質分子の機能の阻害が問題となる。生きたタンパク質分子が働く現場を観察するためには、蛍光色素 1 分子を見ることのできる顕微鏡が望まれたのである。

1) 慶應義塾大学理工学部物理学科, 日本学術振興会特別研究員, 2) 慶應義塾大学理工学部物理学科 専任講師, 3) 同教授

## なにが蛍光色素1分子イメージングを難しくしていたか？

蛍光顕微鏡とは、試料に特定の波長の光(励起光)を照射し、それを吸収した色素の発する波長の異なった光(蛍光)だけをフィルターで分けて観察するというものである。理想的には、励起光はフィルターで完全に遮断され、真っ暗な視野に蛍光だけがポツンと現れるはずなのである。暗闇で光る蛍光は、どんなに弱くてもよく目立つ。蛍光色素1分子から得られる光子の数、さらにそのうち何個の光子がカメラに到達するかなどの見積りから、蛍光色素1分子でも十分に像としてとらえることができることが計算されていた。

それでは、なぜ今まで1分子イメージングが達成されていなかったか？それは顕微鏡自体からの大きな背景光が原因であった。励起光が漏れてしまったり、光ってはならないはずの顕微鏡内のフィルターやレンズが蛍光を発してしまうおかげで、蛍光色素1分子からのわずかな光が背景光に埋もれてしまっていたのである。昼間には星は見えない理屈である。

顕微鏡下での蛍光色素1分子イメージングへの道は、この背景光を減らす工夫をすることであった。光ファイバーの先端の小さな穴からしみ出る光や全反射の界面からしみ出る光(共に近接場と呼ばれる)を利用して試料を局部的に励起したり、<sup>7-9)</sup> レーザー光を小さくしほり顕微鏡を通さずに直接試料に照射したり<sup>10)</sup> することにより、ついに1個の色素分子の像が観察されることになった。なかでも、船津らによる実験は、それまでの成功例が乾燥した動かない分子の観察にとどまっていたのに対し、水溶液中でのタンパク質分子1分子の酵素反応をとらえるという画期的なものであった。

我々も、生体分子機械の働く環境である水

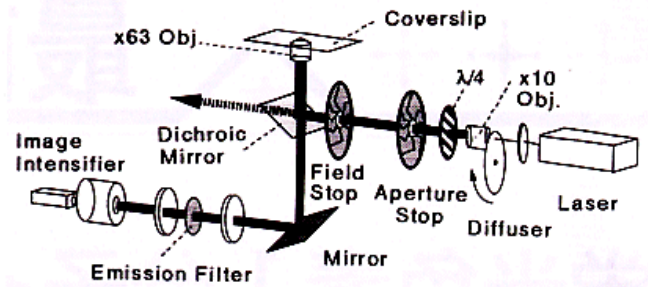


図1. 蛍光色素1分子イメージングのための改良を施した顕微鏡の構造

溶液中での蛍光色素1分子イメージングを試みてきた。どこにでもある蛍光顕微鏡に最小限の手を加えることで1分子イメージングを成功させれば、多くの人々と1分子を見る喜びを分かち合えると考えたのである。さらに、現存する、あるいはこれから開発されるであろう、様々な顕微鏡技術・周辺技術との同時利用が容易となろうという期待もあった。市販の蛍光顕微鏡をそのまま使ったときの背景光は、非常に高かった。しかし、原因追求と改良の結果、水中で動き回る分子を連続観察することができるレベルにまで背景光を減少することに成功した。<sup>11)</sup> 最大のポイントは、不要な迷光が顕微鏡内で散乱されることを防ぐことであった(図1)。

## 1分子観察

いよいよ1分子の観察である。十分に濃度の低い試料を顕微鏡で覗いて輝点が見えたからといって、いきなり「1分子です」というわけにはいかない。やはり1分子であることが納得できるような、標準試料がほしいのである。我々は、簡便さ、一般性、応用性などを考え、アクチンを純度の高いローダミン<sup>12)</sup>で染色し、試料とした。アクチンはモノマーが集まってフィラメント(線維構造)をつくる。我々はまずアクチンモノマー1個に1個の蛍光色素を結合し、色素を結合していないアクチンモノマーと混ぜ、様々なラベル率のフィラメントをつくり観察した(図2, 3)。フィラ



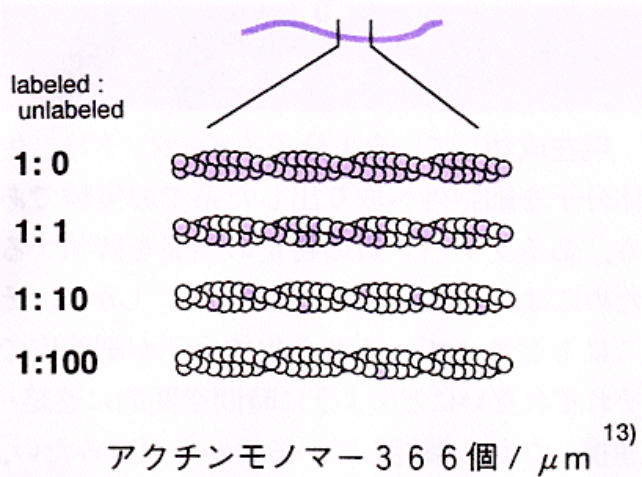


図 2. アクチンフィラメントの構造とラベル率の変化の模式図

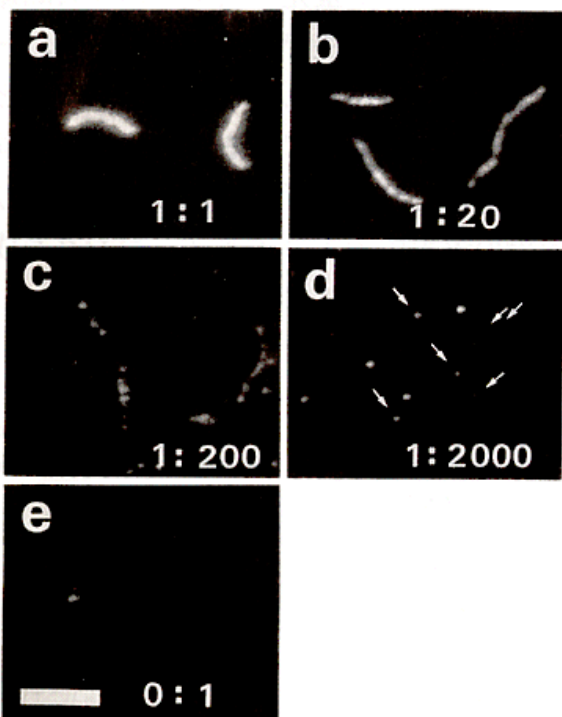


図 3. ラベル率の異なったアクチンフィラメントの観察

染色アクチンと無染色アクチンの比はそれぞれ(a)1:1.5, (b)1:25, (c)1:250, (d)1:2,500, (e)0:1である。(d)の矢印で示すスポットが蛍光色素1分子。(e)はたまたま見つかった汚れ。Bar=10  $\mu\text{m}$ 。

メントの構造は分かっているので、<sup>13)</sup> 1  $\mu\text{m}$ あたりの蛍光色素の数が分かり、1分子からの蛍光強度も見積もれるのである。図3dに示すスポットが蛍光色素1分子である。アクチンをミオシンの上において滑らせると、蛍光スポットもアクチンと同じ速度で運動した(図4)。

ファルマシア

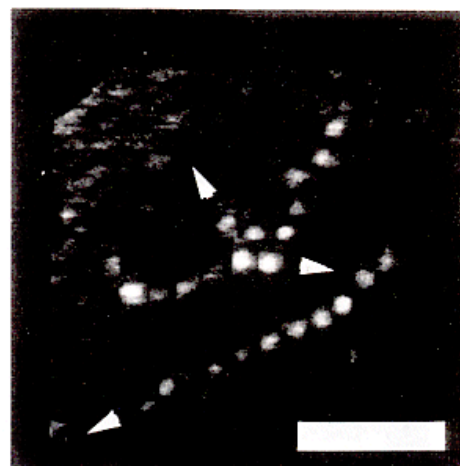


図 4. ミオシン分子上を運動するアクチン(ラベル率1:2,500) 矢印はアクチンの進む方向を示し、スポットはアクチンに結合したローダミン1分子。各スポットは0.27秒積算、Bar=10  $\mu\text{m}$ 。

観察されたものがアクチンに結合した色素であり試料に混入した不純物でないことが証明できたわけである。タンパク質分子に結合した蛍光色素1分子、その水溶液中での運動を連続的に観察することに成功したことになる。

4

#### 偏光を利用した1分子回転のリアルタイムイメージング

蛍光色素1分子を結合した、生きたタンパク質分子の動きが追えるようになった。こうなると、そこで何が起きているのかの情報を取り出したい。我々は色素の偏光特性を利用して、分子1個の回転のリアルタイムイメージングを行った。

色素から出る蛍光は偏光している。カメラの直前に、偏光ビームスプリッターを入れ(図5a)、1分子からの蛍光を縦・横の偏光成分に分けて同時に観察する。それぞれの明るさの変化を時々刻々とらえることにより、瞬間瞬間の色素の向きが分かるのである。つまり、色素分子が縦を向けば縦偏光成分が強くなり、横を向けば横偏光成分が強くなるはずである。図5bは滑走中のアクチンに結合した色素の向きの変化をとらえたものである。両偏光成分

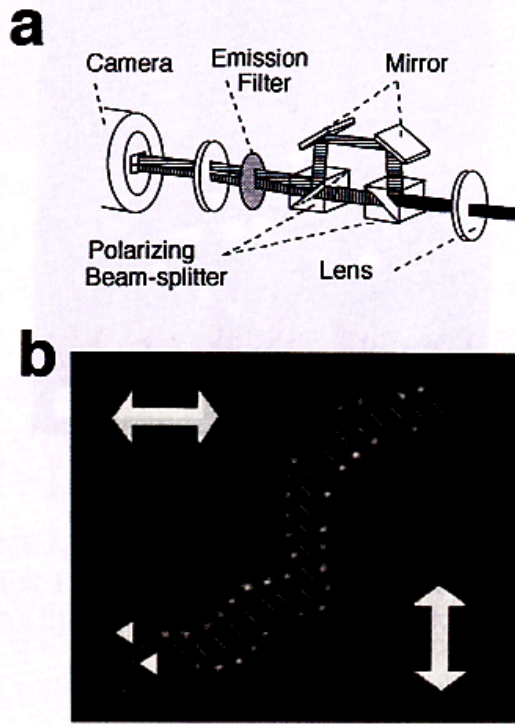


図 5. 1 分子の向きの変化の観察  
(a)カメラの直前に設置した偏光ビームスプリッターとその光学系、(b)ミオシン上を滑走するアクチンに結合した色素の蛍光像を、偏光ビームスプリッターを通して観察したもの。縦・横偏光成分を同時に観察し、アクチンの軌跡にそって並べた。各ペアは 0.27 秒積算。

の明るさが交互に変化していることが分かる。色素はアクチン分子にしっかりと結合しているので、この回転はアクチン分子の回転を反映している。アクチンフィラメントが前進と共に自身の軸の回りに回転する<sup>14)</sup> 様子がとらえられたのである。この回転はアクチンフィラメントにたくさんの色素分子を付けてしまったのではとらえられない。多数の色素がフィラメントの軸回りに回転対称に結合すると、回転しても見分けがつかないからである。1 分子イメージングで初めてとらえられた回転である。

回転が見えたということは、向きの変化をとらえられるということである。遺伝子工学で色素の結合する場所を選ぶことにより、分子内のここぞと思う部分の構造変化を目の前で見ることができるようになると期待される。

現在成功している 1 分子イメージングは、生体分子を細胞外へ取り出した系での実験である。あるタンパク質の特定の機能を解明するためには、非常に有効な系である。しかし、そこにとどまらず、これら生体分子が細胞内でそれぞれ互いにどのように時間空間的に連絡・連携しながら機能しているのかを見てみたい。我々が、あえて普通の蛍光顕微鏡を改良することで蛍光色素 1 分子をめざした理由は、実はここにある。細胞内での 1 分子イメージングには細胞自身が蛍光を出すという大問題があり、単純には解決できない。しかし、一昔前に見えないと思われてきたものが次々と見えるようになってきている。生体内の協同現象の理解に更に 1 歩近づくためにも、ぜひ細胞内での蛍光色素 1 分子イメージングを成功させたい。

#### 引用文献

- 1) T. Hirschfeld, *Appl. Opt.*, 15 (12), 2965 (1976).
- 2) R. A. Mathies, L. Stryer, "Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences", ed. by D. L. Taylor *et al.*, AR Liss, New York, 1986, p.129.
- 3) K. Peck *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86, 4087 (1989).
- 4) E. B. Shera *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, 174 (6), 553 (1990).
- 5) L. S. Barak, W. W. Webb, *J. Cell Biol.*, 90, 595 (1981).
- 6) K. Morikawa, M. Yanagida, *J. Biochem.*, 89, 693 (1981).
- 7) E. Betzig, R. J. Chichester, *Science*, 262 (26), 1422 (1993).
- 8) W. P. Ambrose *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 72 (1), 160 (1994).
- 9) T. Funatsu *et al.*, *Nature*, 374, 555 (1995).
- 10) M. Ishikawa *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 33, 1571 (1994).
- 11) I. Sase *et al.*, *Biophys. J.*, 69, 323 (1995).
- 12) J. E. T. Corrie, J. S. Craik, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1, 2967 (1994).
- 13) E. H. Egelman, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 6, 129 (1985).
- 14) T. Nishizaka *et al.*, *Nature*, 361, 269 (1993).