ビデオレート共焦点顕微鏡による 1分子蛍光イメージング

早稲田大学理工学部物理学科 多田隈尚史

1. はじめに

近年、水溶液中での蛍光色素1分子イメージング技術が我が国で開発された結果、1分子生理学が大きく花開いた^{1,2)}。1分子イメージングにより、モータータンパク質の運動や、酵素による化学反応の観察、あるいはモータータンパク質の化学力学変換過程の同時計測がなされた。最近、1分子イメージングは生きた細胞にも適用され、膜レセプターや接着タンパク質がイメージングされている^{3,4)}。これらの実験では、おもにエパネッセント場を利用した全反射顕微鏡を用いることで、照射範囲を狭め、背景光を減らして1分子イメージングを実現してきた。しかし、生きた細胞に適用する場合、全反射を用いるこの方法ではイメージングが膜表面付近にだけ制限されてしまう。そこで我々は細胞内における任意の高さの3次元1分子イメージングをめざして、共焦点顕微鏡を用いた蛍光色素の1分子イメージング法を開発したので⁵⁾、本稿で紹介する。

2. リアルタイム共焦点顕微鏡

今回我々は市販のビデオレート型共焦点ユニット(横河電機CSU-10)を用いてイメージングを行った(図1)。通常の共焦点顕微鏡は1個のピンホールで画面全体をスキャンするので、1枚の画像を得るのに時間がかかり、また観察領域も小さい。一方、CSU-10は、ニッポウディスクと呼ばれるピンホールが多数(～2万個)あいているディスクが毎分1800回転することにより、顕微鏡の視野(本研究では $45 \times 30 \mu\text{m}$)をリアルタイム(最速で1秒間に～500枚の画像)で観察することが可能となっている⁶⁾。また、通常のニッポウディスク型共焦点ユニットは1枚のニッポウディスクで構成さ

れており、入射光の数%しか透過しないのに対して、CSU-10は2枚のニッポウディスクをもっており、透過率が50%程度に達している。その結果、ピンホールの部分で生じる反射光などによるノイズが大幅に削減され、画質の改善が実現されている。我々は蛍光色素1分子イメージングを実現するためにさらに“ひとくふう”をこらした。まず、標準では共焦点ユニットに光ファイバ(N.A.0.11)で入射光を導入しているが、代わりにレーザー光(YAG2倍波: 532 nm(～50 mW)またはHe-Ne: 633 nm(～20 mW))をN.A.0.01で直接共焦点ユニットに導入した。このことで、1分子イメージングに必要な励起光強度を稼ぐとともに、途中の光学部品に散乱されて迷光となる入射光の割合を少なくし、ノイズを低減した。次に光学フィルターを標準のものから、より1分子イメージングに適したものへと変更した(詳細は文献5参照)。

イメージングデバイスには超高感度カメラを用いた。我々はイメージ・インテンシファイアー(VS4-1845, Video Scope)の後ろにICCD(ICCD-350F, Video Scope)をつなげてイメージングしたが、もちろんICCDの代わりにSIT(浜松フォトニクス)やEB-CCD

図1 リアルタイム共焦点顕微鏡システム
ニッポウディスク型共焦点ユニット(横河電気CSU-10)
と超高感度カメラを組み合わせる。詳細は本文参照。

Single Molecule Imaging by Real-Time Confocal Microscopy

Hisashi TADAKUMA

Department of Physics, School of Science & Engineering, Waseda University

図2 カバーガラス上の蛍光1分子イメージング

(a) TMR-キネシンの蛍光像 (8frame平均像)。スケールは2 μm 。(b)(a)の矢印の蛍光分子の量子的退色 (33ミリ秒ごとの生データ)。(c) 励起光強度を変えた時の1段階で退色したTMR-キネシ分子の蛍光強度。(d) 励起光強度による退色速度 (○: TMR, ●: IC5)。

(浜松フォトニクス)を用いても問題はない。我々はさらにイメージ・プロセッサ (Argus20, 浜松フォトニクス) でコントラストを増強したのちに最終的にS-VHSで録画をした。

3.2次元における1分子蛍光イメージング

この顕微鏡を評価するために、ガラス表面上の蛍光色素標識したキネシン分子を観察した。ニッポウディスク型共焦点顕微鏡は多数のピンホールによる照明方法であるため、干渉による励起むら (不均一な励起) が気になるところであるが、カバーガラス一面にテトラメチルローダミン (TMR) ラベルしたキネシン分子 (分子当たりのラベル率0.6) を結合させて観察したところ、むらは10%以下であると見積もられた。次に、TMR-キネシンの濃度を薄くしていったところ、だんだんと観察される分子の数が減っていき、個々の輝点を観察できるようになった (図2a: 励起光強度1.9 W/mm^2)。これらの輝点がそれぞれ1個1個の分子であることは以下のことから示唆された。まず、これらの輝点の蛍光強度の時間変化を観察すると、1蛍光分子に特徴的な性質である階段退色が観察された (図2b)。次に観察した輝点のうち、1段階で退色したものと2段階で退色したものの分布を取ると、2段階で退色した輝点の明るさの平均は1段階のものの約2倍であった。これらの結果は、我々の共焦点顕微鏡で1蛍光色素のイメージングができていていることを示唆している。

続いて、より詳細な評価を行った。よく知られている共焦点顕微鏡の問題として、色素の蛍光強度の飽和がある (励起光を強くしても蛍光強度が上がらない)。そこで、励起光強度を変えた時 (0.65 ~ 3 W/mm^2) の色素 (TMR) の蛍光強度を測定した (図2c)。すると、事前の予想と違って、蛍光強度は励起光にほぼ比例して強くなった。我々の観察条件では、観察画面を256個のピンホールで同時にスキャンしており、励起光強度1.9 W/mm^2 の時には、ピンホールあたりの励起光強度は12 μW である。1本のビームで画面をスキャンするやり方では励起光がピンホールあたり約1 mW の時に飽和が起り始めると報告されており、我々の観察条件では飽和強度の1/100で観察をしていることになる。

また、退色速度を各励起光強度で計測したところ、励起光強度にほぼ比例した (図2d)。その結果、励起光強度0.5 W/mm^2 の時ではTMRが~10秒、IC5 (Cy5とほぼ同じ波長特性の色素) が~2秒程度観察できることがわかった。また、上記のビデオレート共焦点顕微鏡に475 nmのレーザーを入射してGFP (S65T)を観察したところ、励起光強度1.2 W/mm^2 で~1秒程度観察できた。

4.3次元の1分子蛍光イメージング

まず、3次元に固定した分子の観察を行った。キネシン分子をポリアクリルアミドゲルの中に固定して観察したところ、分子がカバーガラス面から離れるほど、暗く見える傾向があることがわかった (図3a)。大雑把に

図3 3次元の1分子蛍光イメージング

(a) ポリアクリルアミドゲルに埋まったTMR-キネシン分子の相対蛍光強度 (カバーガラス面上のTMR-キネシン分子の蛍光強度を1とした。測定数は $N = 76 \sim 116$)。 (b) 0.1 μmの蛍光ビーズをゲルに埋めて0.1 μmごとに蛍光観察した時の相対蛍光強度 (10個のビーズの平均値)。 (c) TMR-キネシンの拡散運動 (60 % ショ糖溶液中、23 秒) の連続したframeの蛍光像 (33ミリ秒ごと)。スケールは2 μm。

言えばガラス面から10 μm離れると、焦点の合っている分子の明るさは、カバーガラス面上の分子に比べて約半分になっている。より詳細に観察するために、キネシン分子の代わりに0.1 μmの蛍光ビーズをポリアクリルアミドゲルの中に固定して焦点面を0.1 μmごとに変えながら、観察を行った (図3b)。するとカバーガラス面から遠ざかるにつれて、焦点が合った時の蛍光強度が下がるとともに、半値距離 (蛍光強度が焦点面の半分の強度になるまでの距離) が広がることがわかった。たとえば、カバーガラス上では半値距離は $0.53 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (平均 $\pm$ S. D.) であるが、10 μm上では $1.05 \pm 0.1 \mu\text{m}$ となった。これは今回の実験では油浸のレンズを用いているため、水と油の屈折率の違いが影響しているものと考えられる。実際、水浸の対物レンズを使えばカバーガラス面からの距離による影響は減少する (データは示さず)。

次に3次元を拡散運動しているキネシン分子を観察した。観察はビデオレートの時間分解能において測定するため、粘性の高い溶液中 (60 % ショ糖溶液中、水の53.2倍の粘性) で行った。すると、溶液中を拡散運動する分子の x - y 方向の軌跡を追跡することができた (図3b)。そこで、 x - y 方向の軌跡から2次元の平均2乗変位を求めてプロットしたところ、時間間隔に対して線形に増加していった。この傾きとアインシュタインの式から、拡散定数を求めると、 $0.75 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であった。また、今回の観察では共焦点観察断面 ($\sim 1 \mu\text{m}$: 輝点の蛍光強度が焦点面の強度の20 % の範囲を断面の高さとし

た。図3b参照) を固定しているため、分子が断面を通過する時間からも拡散定数を見積もることができた ($0.64 \mu\text{m}^2/\text{s}$)。これらの値を、水溶液中の自由拡散時に換算すると $34 \sim 40 \mu\text{m}^2/\text{s}$ となり、多分子の測定結果とほぼ同様の値となった。

以上の結果は、我々の顕微鏡システムで1個の蛍光色素が3次元でリアルタイム観察できることを示しており、細胞内における1分子蛍光イメージングの際に広範な応用が期待される。

5. まとめ

本稿では、ビデオレート型共焦点顕微鏡を用いた蛍光1分子観察に関して述べてきた。初めの部分でも触れたが、細胞における1分子蛍光観察にはいくつかの方法があり、それぞれ一長一短ある。まず、膜近傍の分子を観察するのであれば、手軽さとコントラストの良さから対物型エパネッセント照明が、初めに挙がる選択肢であろう。また、細胞内でも現象を観察するのに比較的試料濃度が薄くてもよく、輝点の密度が非常に低い場合、あるいは細胞内の特定の場所に停止している分子を観察する場合などは、落射照明⁷⁾や斜光照明⁸⁾といった方法が有効であろう。一方、現象を観察するのにある程度試料濃度が必要で背景光がやや高い場合や、任意の高さで動き回る輝点を観察・追跡したい時は、共焦点顕微鏡が最も有効である。実験の目的に合わせて、照明法を選択するのが肝要であろう。

謝 辞

本研究を指導していただいた船津高志氏に感謝します。また、本研究を遂行するにあたっては横河電機の田名網さん・市原さんにお世話になりました。この場を借りて感謝します。

文 献

- 1) Harada, Y. *et al.* (1998) *Methods Cell Biol.* **55**, 117-128.
- 2) Weiss, S. (1999) *Science* **283**, 1676-1683.
- 3) Sako, Y., Minoguchi, S. and Yanagida, T. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 168-172.
- 4) Iino, R., Koyama, I. and Kusumi, A. (2001) *Biophys. J.* **80**, 2667-2677.
- 5) Tadakuma, H., *et al.* (2001) *BBRC.* **287**, 323-327.
- 6) Ichihara, A., *et al.* (1996) *Bioimages* **4**, 57-62.
- 7) Kues, T. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12021-12026.
- 8) 徳永万喜洋, 今本尚子: 第39回日本生物物理学会年会 (大阪, 2001年10月6 ~ 8日)。

多田隈尚史(ただくま ひさし)
早稲田大学理工学部物理学科 助手
連絡先: 〒169-8555 新宿区大久保3-4-1
E-mail: tadakuma@aoni.waseda.jp