エバネッセント場照明を使った蛋白質 1分子のイメージングと計測*

齋藤 究**

Imaging and Measurement of Single Protein Molecules Using Evanescent Field / Kiwamu SAITO

Key words: motor protein, evanescent field, single molecular imaging, fluorescence microscopy, Cy3-ATP

1. はじめに

近年、1分子や1原子というキーワードを物理や化学の分野でよく耳にするが、生物、特に蛋白質分子の分野でも同様である。蛋白質の特性を1分子レベルで計測することによりそれまで計測できなかった現象が明らかになるからである。この1分子計測技術の進歩は単一蛍光分子のイメージングに負うところが大きい。このイメージングを可能にしたのが局所的な領域を照明できるエバネッセント場照明である。本稿ではエバネッセント場照明を使った蛍光観察の特徴、実際の顕微鏡、そして蛋白質1分子計測への応用例について報告する。

2. 1分子計測

蛋白質分子の動作メカニズムを解明するうえで有効となる点の一つは、生きたままの状態での特性を計測することである。蛋白質の動作メカニズムはその構造から類推できる。その際、X線結晶構造解析や電子顕微鏡法が持つ高分解能が有力な手法となる。しかし、どちらの方法も固定した分子を、いわば反応過程の一瞬を画像化しているにすぎない。蛋白質分子はその反応過程において程度の差こそあれ構造変化を伴っていることは間違いなく、蛋白質の動作メカニズムはダイナミックな動きの中に隠されている。生きたままの蛋白質分子を計測することにより得られる情

報も重要であり、そのような計測を可能にするのが蛍光色素をプローブとして使う方法である。蛋白質分子に結合させた蛍光色素が放出する蛍光からは、分子の存在だけでなく、蛋白質分子の構造変化や他分子との相互作用、周囲の環境など様々な情報が得られる。しかも、蛋白質の機能を損なうことなく標識することが可能である。

もう一つ有効となる点は、蛋白質1分子を対象としてその特性を計測することである。蛋白質が触媒する反応のエネルギーは、ブラウン運動のエネルギー $k_B T$ (k_B : ボルツマン定数, T : 絶対温度) の高々数倍から数十倍の大きさである。反応に関与するエネルギーが熱ゆらぎと同程度ということは、個々の反応が非常に確率的で、時間的にもエネルギー的にも多様であることを意味する。このような現象を多分子系で計測しては、反応の微細なメカニズムが平均化により隠されてしまうが、1分子を計測することにより反応の微細構造に迫ることができる。以上二つの点、生きたままの蛋白質を1分子で計測することが、エバネッセント場照明による蛍光顕微鏡法により可能となる¹⁾。

3. エバネッセント場照明蛍光顕微鏡

蛍光色素1分子は市販の高感度TVカメラが検出するに十分な量の光子を放出している。しかし、通常の水銀ランプやキセノンランプを用いた落射照明では蛍光色素1分子を実時間観察することが困難であった。それは、微弱な蛍光のシグナルが背景光の中に埋もれてしまうからである。背景光の原因として、励起光の漏れや光学系に含まれるガラスが出す蛍光、水のラマン散乱などがあげられる。これらの背景光を取り除くことが蛍光色素1分子観察のポイントである。近年、対物レンズやバンドパスフィルタなどの光学系の改良により、通常落射蛍光顕微鏡でも蛍光色素1分子を画像化することが可能となったが、エバネッ

* 原稿受付 平成12年2月21日

** 金沢大学理学部(金沢市角間町)
1992年大阪大学基礎工学研究科物理系専攻博士後期課程中退、同年新技術事業団柳田生体運動子プロジェクト研究員、1997年金沢大学理学部物理学科助手、現在に至る。工学博士。研究分野: モーター蛋白質分子の1分子計測

図1 蛍光照明の比較。(a) 落射蛍光照明. 光路中にある蛍光色素分子(星印)が励起され蛍光を放出する。(b) エバネッセント場照明. ガラス表面近傍のエバネッセント場領域内にある蛍光色素のみを選択的に励起できる。

セント場照明を使用すればより感度よく蛍光を検出することが可能である。

光は自由空間を減衰することなく伝搬する性質を持つが、特殊な境界条件下では強度が指数関数的に減衰する局在した電磁場を形成する。その代表的な例が光の全反射により生成されるエバネッセント場である。高屈折率の媒質から低屈折率の媒質に臨界角以上で入射したときに、光は全反射する。このとき、低屈折率の境界面近傍にエバネッセント場が形成される。エバネッセント場の主要な特徴は、境界面近傍に定在し遠方へ進行しないことと、電場の強度が境界面から離れる方向に指数関数的に減衰することである。界面からの距離を z 、その点での強度を $I(z)$ とすると

$$I(z) = I(0)e^{-z/d}, \quad d = \frac{\lambda_0}{4\pi} (n_2^2 \sin^2 \theta - n_1^2)^{-1/2}$$

となる。ここで、 λ_0 は真空中の波長、 n_1 は溶液の屈折率、 n_2 はガラスの屈折率、 θ は入射角である。浸入長 d は緑色の可視光線の場合、約 150 nm である。

図1に一般に蛍光顕微鏡に使われている落射照明とエバネッセント場照明の比較を示す。落射照明における励起光は試料全体を照射するので、試料中に存在するすべての蛍光色素が励起され蛍光を放出する。一方、エバネッセント場照明ではガラス表面近傍のエバネッセント場内にある蛍光色素しか励起されない。対物レンズで蛍光像を画像化する限り回折限界を超えた XY 方向の分解能を得ることは不可能であるが、照明にエバネッセント場を利用することで励起光の Z 方向分解能を上げ、感度よく蛍光を検出することが可能となる。

4. 顕微鏡装置

蛍光色素1分子を観察するための光学系について説明する。光源としてレーザーを用いる。レーザーを全反射させる光学系にはプリズム型と対物レンズ型の2通りがある。図2にプリズム型の全反射照明を示す¹⁾。倒立顕微鏡のステージ上方からレーザーを入射し、レンズによりスライドガラス

図2 プリズム型エバネッセント場照明. スライドガラスと水溶液の境界面にエバネッセント場が発生する。

図3 対物レンズ型エバネッセント場照明. 開口数1.4の対物レンズを使用するとカバーガラスと水溶液の境界面で入射レーザーを全反射させることができる。

下側にある試料面に集光する。臨界角よりも大きな入射角を得るために、グリセロールを介して石英プリズムとスライドガラスを接触させる。蛍光色素1分子からの蛍光は微弱であるから、できるだけ背景光を減少させなければならない。市販の顕微鏡用スライドガラスでも観察可能であるが、石英ガラス(屈折率1.46)を使用する方が背景光を少なくできる。蛍光は開口数の大きな対物レンズで集光し、SITカメラなどの高感度TVカメラで検出する。カバーガラス表面の傷等で散乱し、対物レンズ側へ進行波として漏れてくるレーザーはノッチフィルタや蛍光の波長に適したバンドパスフィルタで取り除く。

図3に対物レンズ型エバネッセント場照明の原理を示す²⁾。対物レンズの開口数 NA と開口角 θ 、ガラスの屈折率 n の間の関係は $NA = n \sin \theta$ と表される。ガラスと水の屈折率をそれぞれ1.52と1.33とすると、開口数1.4の対物レンズにおける開口角は67.1°となる。この角度は臨界角61.0°よりも大きいので、対物レンズ側から入射させたレーザーをカバーガラスと溶液の境界面で全反射させることができる。落射照明用のダイクロイックミラーを使って、無限遠補正系対物レンズの周辺部にレーザーを導入し、同じ対物レンズを使って蛍光像を観察する。1分子の蛍光色素を観察する場合でも市販のカバーガラスを使用して問題ない。

プリズム型エバネッセント場照明と対物レンズ型エバネッセント場照明の特徴を比較すると次のようになる。対物レンズ型の場合、対物レンズの開口数による制限から

図4 蛋白質1分子のイメージング。(a) テトラメチルローダミン標識ミオシン1分子の1ビデオフレーム画像。スケールバーは2 μm 。(b) ビデオ画像から解析した蛍光強度(任意単位)の時間変化。挿入図は蛍光色素(星印)で標識したミオシンの模式図。

レーザの集光に自由度が少ない。光学系の構築はプリズム型の方が容易である。プリズム型では入射角を85°程度まで大きくできるので、エバネッセント場のしみを浅くしたいときには有利である。ただし、試料をスライドガラスとカバーガラスで挟むため、試料の厚さが対物レンズの作動距離に制限されるし、溶液交換などもしにくい。一方、対物レンズ型ではプリズムが無いため溶液側には自由な空間ができる。試料の厚さに制限はなく、細胞の表面を観察することも可能だし、原子間力顕微鏡などスキニング型の顕微鏡やガラスニードルを利用したマイクロマニピュレーション装置などと組み合わせることも可能である。また、両方式とも通常の蛍光顕微鏡と同様に励起用レーザを複数色導入することで蛍光二重染色サンプルを同時に観察することも可能である³⁾。

5. エバネッセント場蛍光顕微鏡の応用

化学エネルギーを力学エネルギーに変換している生体分子モーターを中心に、エバネッセント場蛍光顕微鏡による蛋白質1分子のイメージングと、その手法を応用した1分子計測の例を紹介する。

5.1 1分子イメージング

図4は蛍光色素テトラメチルローダミンで標識した筋収

図5 ミオシンS1によるATP加水分解反応の可視化。(a) ガラス表面に固定したS1にCy3-ATPが結合したときのみ明確な輝点として観察され、Cy3-ADPとして解離する。(b) あらかじめS1が存在することを確認しておいた点におけるCy3-ATPの蛍光強度をフロンカウンタで測定。蛍光強度のベースラインは溶液中に含まれる50 nM Cy3-ATPによる蛍光。

縮蛋白質ミオシンを対物レンズ型エバネッセント場照明で励起し、SITカメラで撮影した像である。ミオシンは筋肉中でフィラメントを形成し、同じくフィラメントを形成しているアクチンと相互作用することで力を発生している。ミオシン分子は双頭構造をしており(図4(b)の挿入図)、その頭部(S1)がATP加水分解と力発生の機能を有する。図4(a)ではモノマー状態のミオシンをガラス表面に固定している。頭部1個を蛍光色素1個で標識しているので、輝点の蛍光強度を調べると、1または2ステップで退色する(図4(b))。さらに、退色のステップは1ビデオフレームで完了している。この2点は蛍光色素1分子が画像化されていることを示している。蛋白質1分子の可視化は他のモーター蛋白質分子にも応用されている。たとえば、細胞内で物質を輸送しているキネシン1分子がレールとなる微小管上を滑走する様子も画像化されている⁴⁾。

5.2 ATP加水分解反応のイメージング

蛍光色素1分子の実時間画像化が可能になったので、基質分子を蛍光標識することで1分子化学反応を可視化できるようになった¹⁾²⁾。図5にミオシンS1による蛍光性ATPアナログCy3-ATPの加水分解反応計測例を示す。ガラス表面には蛍光色素Cy5で標識したS1を固定しておく。はじめにCy5を励起しS1の位置を確認する。次に励起光を切り替えてCy3-ATPを観察する。溶液中に存在するCy3-ATPは激しくブラウン運動しているので明確な輝

図6 化学反応と力学反応の同時計測模式図。ビーズはガラス表面との接触を避けるため、数 μm 表面から離れている。アクチンフィラメントをエバネッセント場領域内に入れるため、エッチングによりテーブルを作成しその上にミオシンを固定する。

点としては観察されないが、ガラス表面上の S1 に結合するとブラウン運動が減少し輝点として観察される。さらに、加水分解し Cy3-ADP になると S1 との結合が弱くなり解離する。つまり、S1 が存在する点における蛍光の点滅は ATP の加水分解反応を意味している (図5(a))。アバランシェフォトダイオードを使って蛍光のフォトンカウントを行えば TV 画像よりも高い時間分解能で計測できる。図5(b) はその一例であるが、Cy3-ATP が結合している時間も結合の間隔も確率的であることがわかる。従来の落射照明では溶液全体の Cy3-ATP を励起してしまうので、表面の Cy3-ATP はその蛍光に隠れ可視化することはできない。励起領域を限定できるエバネッセント場照明のみが実現できる1分子計測技術である。

5.3 化学反応と力学反応の同時計測

ミオシン分子の本質は化学エネルギーを力学エネルギーに変換することにあるから、そのメカニズムを解明するためには化学反応と力学反応を同時に計測することが有効である。1分子可視化技術と光ピンセットなどの操作技術を組み合わせれば二つの反応を同時に計測することができる⁵⁾。光ピンセットはレーザの焦点に微小な粒子を捕捉する技術であるが、捕捉された物体の平衡位置からのずれを検出することで物体が受けた力を計測することもできる。光ピンセットとエバネッセント場照明を組み合わせた化学・力学同時計測の概略を図6に示す。2本の光ピンセットそれぞれに直径 $1\mu\text{m}$ 程度のポリスチレンビーズを捕捉しておき、その間にはアクチンフィラメントを張り渡しておく。ガラス表面に固定されたミオシンとアクチンフィラメントが相互作用することで発生した力は、捕捉された

ビーズに変位を与える。ビーズの像を4分割フォトダイオードに投影し、変位を nm オーダで計測することによりミオシン1分子が発生する力を計測する。同時に、前述の方法で ATP 加水分解反応を計測する。

6. おわりに

1995年に水溶液中で蛍光色素1分子を実時間観察できるようになったが¹⁾、この方法は蛋白質1分子計測に幅広く応用されている。本稿で紹介した以外にも、微小ガラス針を使ったミオシン1分子の張力計測⁶⁾やDNAに結合するRNAポリメラーゼ1分子の画像化⁷⁾などが報告されている。近年、様々な蛍光色素が開発されているし、イメージンテンシファイアなど光検出装置の感度も向上している。エバネッセント場照明を利用した蛋白質1分子計測技術は、適用できる蛋白質の範囲においても、新たな計測方法の開発においてもまだまだ発展の期待できる分野である。

引用文献

- 1) T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito and T. Yanagida : Imaging of Single Fluorescent Molecules and Individual ATP Turnovers by Single Myosin Molecules in Aqueous Solution, *Nature*, **374**, (1995) 555.
- 2) M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, A. H. Iwane and T. Yanagida : Single Molecule Imaging of Fluorophores and Enzymatic Reactions Achieved by Objective-type Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 1, (1997) 47.
- 3) K. Saito, M. Tokunaga, A. H. Iwane and T. Yanagida : Dual-Colour Microscopy of Single Fluorophores Bound to Myosin Interacting with Fluorescently Labelled Actin Using Anti-Stokes Fluorescence, *J. Microsc.*, **188**, 3, (1997) 255.
- 4) R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada and T. Yanagida : Direct Observation of Single Kinesin Molecules Moving along Microtubules, *Nature*, **380**, (1996) 451.
- 5) A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka and T. Yanagida : Simultaneous Observation of Individual ATPase and Mechanical Events by a Single Myosin Molecule during Interaction with Actin, *Cell*, **92**, 2, (1998) 161.
- 6) K. Kitamura, M. Tokunaga, A. H. Iwane and T. Yanagida : A Single Myosin Head Moves along an Actin Filament with Regular Steps of 5.3 Nanometres, *Nature*, **397**, (1999) 129.
- 7) Y. Harada, T. Funatsu, K. Murakami, Y. Nonoyama, A. Ishihama and T. Yanagida : Single-molecule Imaging of RNA Polymerase - DNA Interactions in Real Time, *Biophys. J.*, **76**, 2, (1999) 709.