1 分子蛍光イメージング法による 生体分子の機能と相互作用の解析

船津高志

東京大学大学院薬学系研究科

光技術は、生命科学研究に不可欠な技術となっている。最近の光学顕微鏡周辺技術の進歩により、生体分子の機能を1分子イメージングできるようになり、「1分子生理学」が誕生した。さらに、ナノ・マイクロ微細加工技術と組み合わせることにより、顕微鏡技術に革新的な変化をもたらしている。ここでは、光とナノ・マイクロ技術を使った生体分子の1分子イメージングを解説し、将来を展望する。

ゲノムの塩基配列が決められ、次の目標として残ったのは、実際に発現している遺伝子は何か、またその遺伝子産物（主にタンパク質）は、いつ、どの細胞で、どのように発現しているのか、そして機能は何かという問題である。タンパク質の中には、たった1分子でもモーター、ポンプやスイッチなどの機能を立派に発揮するものがあり、これらは「生物分子機械」と呼ばれている。生物分子機械は、原子がわずか数千から数万個集まったナノメートルの小さな機械であるが、人工のナノテクノロジーが実現できない傑作である。また、生物分子機械のさらに驚くべき特徴は、多数の分子が自己集合して超分子複合体や、複雑なシステムを構築することである。生物は数十億年の進化の過程で、ナノテクノロジーをすでに獲得し、利用していたのである。

生物分子機械の仕組みを解明するためには、1分子計測技術が有効である。生物分子機械が働く様子を1分子レベルで観察したり、あるいは触ったり力をかけたりしながら、その働きを明らかにするのが“1分子生理学”である。1分子蛍光イメージング法は、その技術基盤となっている。この方法を用いて、1分子の生物分子モーターが運動している様子や、1分子の酵素がATPを分解している様子を光学顕微鏡で観察できるようになっている⁽¹⁾。生体分子を役者に喩えるならば、その役者に最高の演技（動き）を見せてもらうためには、最高の舞台を用意する必要がある。マイクロ・ナノ加工技術がこの舞台を提供する。生体分子機械の機能解析にマイクロ・ナノテクノロジーが必須になる理由はここにある。ここでは、マイクロ・ナノテクノロジーを用いた1分子生理

学研究を、具体例を紹介しながら解説する。

1 分子計測の意義

1分子イメージングとは、分子（特に生体分子）の運動や構造変化、機能を原子間力顕微鏡（AFM）や光学顕微鏡などを用いて1分子ごとにイメージングする技術である。まず、1分子で研究する意義を考えてみよう。従来の多分子計測では、試験管内の多数分子の平均値を用いて、その生体分子の性質を表わしてきた。たとえば、濃度1 μM 、体積1 mlの溶液中には、約 10^{15} 個の分子が含まれている。この場合、個々の分子の平均値からのずれを表わす標準偏差と平均値との比は 10^{-7} 以下になり、測定装置に由来する誤差に比べて無視できるほど小さい。したがって、多分子計測では平均値を非常に正確に求めることができる。しかし、多分子計測では、分子のダイナミクスを研究することは困難である。ストップフロー法やケージド化合物を用いて反応開始の同期をとることが行なわれているが、多段階反応を素過程に分離することは難しい。

多分子計測のもう一つの欠点は、平均値から1分子の機能を推論するために仮定を必要とするので、明確な結論を得るのが難しいことである。最も頻繁に使われるのは「すべての分子は同様に振る舞う」という仮定である。しかし、1分子計測により、ミオシン⁽²⁾やコレステロール酸化酵素⁽³⁾などのタンパク質に酵素反応を行なった後、約1秒の間、力を発生したり次の酵素反応を早く行ないやすい性質があることがわかり、この仮定が必ずしも成立しないことが明らかになっている。1分子計測は技術的に難しいが、これによって初めてダイナミクスを明確にとらえることができる。

1 分子蛍光イメージング法の原理

生体分子間相互作用を1分子レベルで解析するには、

図1 ■ 生体分子に結合した蛍光色素の局所励起を実現するための様々な照明法

(a) 伝播するレーザービームを回折限界まで集光させる方法、(b) 光の波長よりも小さい微小開口からエバネッセント場を発生させる方法、(c) ガラスと水溶液の界面で全反射を起こしエバネッセント場を発生させる方法、(d) ガラスに蒸着した金属に微小な穴を開けた構造を配列させたもの

生体分子を蛍光標識して機能している様子を解析すればよい。それには観察対象となる生体分子の数を減らすための局所励起が必要である。そこで、図1に示すように、レーザー光を回折限界にまで集光したり、近接場光を利用して局所励起することにより生体分子の1分子機能解析が行なわれている。以下、これらの方法を解説する。

1. 共焦点光学系を使った解析法

開口数の大きい対物レンズを用いて、たとえば緑色光のレーザービームを回折限界まで絞り込むと、照射領域は直径 $0.4\mu\text{m}$ 、軸長 $2\mu\text{m}$ の円筒となり、体積は 0.1fl となる(図1-a)。蛍光標識した生体分子の濃度を数十 nM 以下にすると、ブラウン運動しながらこの領域を通過する分子の数の揺らぎが蛍光強度の揺らぎとして検出できるようになる。蛍光強度の自己相関関数から分子の数と拡散時間(拡散係数)を求めるのが蛍光相関分光法である⁽⁴⁾。生体分子の結合に伴う上記の物理量の変化を検出することにより、生体分子間相互作用を調べることができる。

回折限界まで絞り込んだレーザービームを走査して画像情報を得るのが共焦点レーザー顕微鏡である。絞り込んだレーザーの焦点と共役な位置にピンホールを置くことにより、走査面の上下の物体から出る蛍光が検出器に届かないようにする。このため光学的な断層像を撮影することができる。ただし、1つのビームで走査すると時間を要するので、高時間分解能で画像を取得するためにマイクロレンズが多数付いたニポードディスクを高速に回転させる方式が使われる。これにより1分子の蛍光色素の像を2ミリ秒毎に得ることができる⁽⁵⁾。

2. エバネッセント場を使った解析法

共焦点光学系は伝播光を使っているので、蛍光色素を励起する領域は波長の半分程度の広がりをもつ。さらに照射領域を小さくする方法として、エバネッセント場(消滅場)を利用する方法がある。

エバネッセント場が発生する代表的な例として、金属コートした光ファイバーの先端に入射光の波長よりも小さい微小開口を設ける方式がある(図1-b)。開口径 $50\sim 200\text{nm}$ のものがプローブとして使われ、これを走査して画像を得る顕微鏡はNSOM(Near Field Scanning Optical Microscopy)と呼ばれる⁽⁶⁾。これは、光の回折限界を越えた分解能で観察が可能であること、STM(走査型トンネル顕微鏡)やAFMなどの他の走査型顕微鏡と組み合わせることが可能であることなどの長所をもつ。しかし、プローブの制御が難しく、時間分解能が悪いという欠点がある。エバネッセント場を発生させる別の方法として、全反射を利用する方法がある(図1-c)。高屈折率の媒質(ガラス)から低屈折率の媒質(水溶液)に臨界角以上で光を入射すると全反射が起こる。このとき、低屈折率の媒質の界面近傍にエバネッセント場が生成される。エバネッセント場は、界面から深さ方向に指数関数的に減衰する局所場である。このため、波長よりも短い領域を照明することができる。エバネッセント場も伝播光と同様に、物体による散乱を受けたり蛍光色素を励起することが可能である。散乱光や蛍光のみを伝播光として検出できるので、背景光がきわめて小さく、1分子の蛍光色素の観察に適している。エバネッセント場は界面のごく近傍しか照明しないので、背景光を抑えられるだけでなく、蛍光標識した生体分子を局所励起でき

るという利点がある⁽⁷⁾。

全反射によるエバネッセント照明の場合、ガラス近傍の照明は可能であるが2次元的には局所励起を実現できていない。このため、ブラウン運動する蛍光分子が背景光になり、1分子の蛍光分子を見るためには、溶液中の分子の濃度を50 nM以下に抑える必要があった。また、生体分子がガラスに吸着されにくい性質であることが必要条件であった。このように厳しい制約があるので、多分子系の実験をすべて1分子系の実験に移行できるわけではなかった。しかし、図1-dのようにガラス基板上に金属薄膜を蒸着して直径数十nmの微小開口を配列させた構造が考案され、エバネッセント場が縦、横、奥行き方向に3次元的に制御できるようになった⁽⁸⁾。このため、照射領域を全反射型エバネッセント照明の場合の1,000分の1にすることができ、従来の濃度の限界より1,000倍も高い濃度(数十 μ M)の生体分子を溶液中に漂わせながら、蛍光相関分光法や1分子蛍光イメージング技術を用いて生体分子間相互作用をイメージングすることが可能となった。この技術と、DNA合成酵素が γ リン酸を蛍光標識したヌクレオチドを取り込みながらRNAを合成するのを利用して、1分子のDNAの塩基配列を解読することが試みられている⁽⁸⁾。

1 分子蛍光イメージング法の具体例

1. 生体分子の動きを見る

まず、生物分子モーターであるキネシンを蛍光標識し、1分子のキネシンが微小管上を滑り運動する様子を観察した例を紹介する⁽¹⁾。微小管をガラスに固定し、蛍光標識したキネシンをATPとともに加え、全反射蛍光顕微鏡で観察すると、1分子のキネシンが500 nm/sの速さで微小管上を滑り運動している様子が観察された(図2)。滑り運動距離の度数分布は、平均1,000 nmの指数分布となった。キネシンは8 nmのステップで微小管上を移動するので、平均120ステップで微小管から外れることになる。キネシンが微小管から一度でも離れるとブラウン運動で拡散してしまうため、外れるまでの平均ステップ数からキネシンが結合・解離の運動サイクルのうち99%以上、微小管に結合したままであることを直接示せたことになる。

蛍光色素が放出した光子をカメラなどで検出する場合、光の回折により波長の1/2程度に広がってしまう。しかし、単一蛍光分子からの蛍光(10,000光子)の輝度分布を冷却CCDカメラで撮影して解析すれば、中心位置を0.5秒の時間分解能、1.5 nmの精度で検出でき

図2 ■ キネシンの微小管上のすべり運動

最上段の写真は、蛍光色素ローダミンで標識した微小管である。2段目以降はCy5-キネシンの顕微鏡写真である。白い点が1分子のキネシンである。数字は経過時間を示している。スケールは10 μ m

る⁽⁹⁾。また、マイクロメートルのサイズのビーズを用いて強力な直接光や散乱光で検出した場合、サブミリ秒の時間分解能、1 nmの精度で解析が可能である。

2. 生体分子間相互作用を見る

次に、エバネッセント場を使った1分子イメージングの例としてシャペロニンGroEL, GroESの相互作用(結合・解離)のイメージングを紹介する^(10,11)。タンパク質が機能を発揮するためには、ポリペプチドが正しく折りたたまれる必要がある。この折りたたみを助けているのが分子シャペロンである。代表的な分子シャペロンである大腸菌のGroELは、GroESと結合して巨大な空洞をもった複合体を形成する。この空洞の内部でATPの加水分解に伴って基質タンパク質の折りたたみが起こる。蛍光色素IC5で標識したGroELをガラスに固定し、変性タンパク質とATP存在下で蛍光標識したGroESがGroELに結合・解離するダイナミクスを観察した(図3-a)。GroESのブラウン運動は非常に速いので、ビデオでは蛍光の輝点として観察されず背景光となるだけである。したがって、ブラウン運動する分子は見えず、結合して止まった分子だけを観察できるのである。このように、分子のブラウン運動と全反射による局所励起を巧みに組み合わせることにより、GroELとGroESの1分子間相互作用をイメージングすることが可能になった(図3-b)。GroESの結合時間を解析した結果、GroESは、ある中間体を経た後から解離する2段階反応であり、

図3 ■ GroEL と GroES の生体分子間相互作用の1分子蛍光イメージング

(a) 実験方法の模式図、(b) EL, ES はそれぞれ GroEL と GroES の蛍光顕微鏡写真。ES の写真中、GroEL の位置に対応する場所を○で示す。矢印で示した GroEL に GroES が結合したり離れたたりしている (矢尻で示す)。数字は観察時刻。スケールは 10 μm

それぞれの反応の時定数は 3 秒と 5 秒と見積もられた。

次に、この中間体の役割を明らかにするため、シャペロニン分子内で起こる変性タンパク質の折りたたみを 1 分子イメージングした。このために、変性した緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein; GFP) は蛍光を発しないが折りたたむと再び蛍光を発する性質を利用した。まず、酸変性させた GFP を GroEL の入った溶液に希釈し、変性 GFP-GroEL 複合体を作製し、スライドガラス上に固定した。その後、GroES と Caged ATP (ATP に保護基を結合させて不活化した化合物。紫外光照射により保護基が分解しミリ秒で ATP が生成される) を加え、顕微鏡下で紫外線を照射して ATP を生成し、シャペロニンの反応を開始させた。その結果、紫外線照射後、3 秒たってから GFP の蛍光が現われた。このようにして、1 分子のタンパク質がフォールディングするところを初めてイメージングすることに成功し、シャペロニンによる GFP 折りたたみに特徴的な 3 秒のタイムラグが明らかになった。新たに見つかった GroEL 中間体は、GroES と変性タンパク質を両方結合していることを示している。GroEL は、変性タンパク質、GroES

と順を追って解離することで確実に基質タンパク質を自らの空洞に閉じ込めていることが、1 分子蛍光イメージング法によって明らかになった。

3. 酵素反応 (化学反応) を見る

ミオシンは筋肉を構成する主要なタンパク質の一つで、ATP の加水分解のエネルギーを使って運動をひき起こすモータータンパク質である。ATP に Cy3 を結合させた蛍光標識 ATP (Cy3-ATP) (図 4-a) を用いて、ミオシン分子が 1 分子の Cy3-ATP を加水分解する様子をビデオで撮影した⁽¹⁾。まず、ミオシンを Cy5 で標識し、ガラス表面に固定する。Cy5 は赤色レーザーで励起すると蛍光を発するので、この蛍光でミオシン分子の位置を確認しておく。次に、緑色レーザーで Cy3-ATP の蛍光を観察する。Cy3 は緑色の光を吸収して橙色の蛍光を発するので、この蛍光の明滅を観察することで、ミオシン分子に Cy3-ATP が結合・解離する様子を観察することができる。ミオシンと Cy3-ATP の結合はきわめて強く、Cy3-ATP がミオシン分子により加水分解されるまでは解離しない。Cy3-ATP が加水分解され Cy3-ADP になると、ミオシンとの結合が弱くなり、ただちに解離して蛍光が見られなくなるので、ヌクレオチド (ATP や ADP) が結合している間だけ輝点として観察される。

酵素と蛍光性基質を直接 1 分子イメージングする他

図4 ■ 酵素反応の検出に使用する蛍光性基質

(a) Cy3-ATP の構造式。ATP のリボースの 2' または 3' の OH にリンカーを介して蛍光色素 Cy3 が結合している。(b) fluorescein di- β -D-galactopyranoside の構造式。無蛍光の分子であるが、 β -ガラクトシダーゼが矢印で示す糖を切断すると蛍光を発するようになる。

に、両者を微小空間に閉じ込めて酵素反応を検出する方法も開発されている⁽¹²⁾。この方法では、光透過性が高く生体試料と相性の良いシリコンゴム poly dimethylsiloxane のチャンバーが用いられる。マイクロ加工技術を利用して、 $fl = \mu m^3$ の微小溶液チャンバーアレイを作製し、この中に必要な溶液を閉じ込めて、高感度に酵素反応を検出する。実際に、 β -ガラクトシダーゼをモデル酵素、fluorescein di- β -D-galactopyranoside (FDG) を基質としてこの方法の有効性が示されている⁽¹³⁾。FDG はフルオレセインの両端に糖を結合させて無蛍光にした分子である (図 4-b)。 β -ガラクトシダーゼが糖を切断すると、フルオレセインが蛍光を発するようになり、微小溶液チャンバー内で酵素反応が高感度に検出された。1 分子イメージングよりも単純で計測が容易なため、酵素反応だけでなく、1 細胞解析や 1 分子 DNA 解析など、広範囲の応用が期待されている。

新しい蛍光標識材料

計測技術が急速な進歩を遂げる一方で、有用な蛍光物質が次々に開発されている。従来は、有機蛍光色素分子を用いてタンパク質を標識していたが、GFP を用いてタンパク質を光らせるという画期的な技術が開発された。GFP は 1960 年代にオワンクラゲ (*Aequorea*) より単離されたタンパク質である。GFP は蛍光を発するための特殊な発光素や補因子を必要とせず、GFP のペプチド自身の構造変化によって発色団を形成する。すなわち、GFP が生物の体内でつくられると自然に蛍光を出すようになる。1990 年代に GFP の遺伝子配列が明らかになると、すごい勢いで細胞生物学の分野で利用されるようになった⁽¹⁴⁾。GFP と様々なタンパク質との融合タンパク質がつくられ、緑色に光る大腸菌、線虫、マウスなどの生物が登場した。これにより、遺伝子の発現を生きたまま GFP の蛍光によって容易に捉えることができたようになった。現在では、GFP のアミノ酸配列を改変したり、イソギンチャクなど、クラゲ以外の生物の蛍光タンパク質が検索され、より明るく、様々な波長の蛍光を発する蛍光タンパク質を得る試みが続けられている。もちろん、1 分子の GFP を観察することも可能である。

有機蛍光色素に代わるものとして、量子ドットが注目を集めている。量子ドットは原子が数十から数千個集まった直径数ナノメートルの塊であり、ある波長の光を照射すると別の波長の蛍光を放出する。量子ドットに閉じ込められた電子のエネルギー順位は量子ドットのサイズに応じて変化するので、サイズを変えることにより蛍

光波長を選択できる。材質が CdSe ならば青から赤、InP や InAs ならば近赤外から赤外の蛍光を利用できる。Si 原子数十個からなる量子ドットも開発されている。これを用いれば、GFP よりも小さな 1~3 nm の直径で青から赤までの蛍光波長を選択できる。量子ドットは広い吸収スペクトルをもち、一方、蛍光のスペクトル幅は狭い。このため、1 色の励起光で多色の量子ドットを同時に励起することが可能である。蛍光の異なる量子ドットの比率を変えてマイクロビーズに埋め込むことにより数万種類のタグ付けが可能である⁽¹⁵⁾。量子ドットは量子効率 が 30~50% と高く、モル吸光係数も $\sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と大きく、非常に明るい。また、有機色素よりも約 100 倍光に対して安定である (すなわち退色しにくい)。このため、細胞内で単一の量子ドットを長時間にわたって観察することも可能である。

*

ナノ開口アレイ、微小溶液チャンバーアレイや量子ドットを用いた蛍光イメージング技術が象徴するように、ナノテクノロジーによる蛍光材料や反応基板の製作が単一分子計測に必要な不可欠になりつつある。バイオテクノロジーはナノテクノロジーと融合することによって従来の計測限界を打ち破り大きく発展することだろう。

文献

- 1) 船津高志：“生命科学を拓く新しい光技術”，船津高志 (編)，共立出版，1999，p. 135.
- 2) A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka & T. Yanagida: *Cell*, **92**, 161 (1998).
- 3) H. P. Lu, L. Xun & X. S. Xie: *Science*, **282**, 1877 (1998).
- 4) 金城政孝：“バイオイメージングでここまで理解る”，楠見明弘，小林 剛，吉村昭彦，徳永万喜洋 (編)，羊土社，2003，p. 126.
- 5) 多田隈尚史，船津高志：文献 4)，p. 95.
- 6) 大津元一，小林 潔：“近接場光の基礎”，オーム社，2003.
- 7) 徳永万喜洋：文献 4)，p. 104.
- 8) M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead & W. W. Webb: *Science*, **299**, 682 (2003).
- 9) A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman & P. R. Selvin: *Science*, **300**, 2061 (2003).
- 10) H. Taguchi, T. Ueno, H. Tadakuma, M. Yoshida & T. Funatsu: *Nature Biotechnol.*, **19**, 861 (2001).
- 11) T. Ueno, H. Taguchi, H. Tadakuma, M. Yoshida & T. Funatsu: *Mol. Cell*, **14**, 423 (2004).
- 12) Y. Rondelez, G. Tresset, T. Nakashima, Y. Kato-Yamada, H. Fujita, S. Takeuchi & H. Noji: *Nature*, **433**, 773 (2005).
- 13) 野地博行：バイオテクノロジージャーナル，**5**, 576 (2005).
- 14) 宮脇敦史 (編)：“GFP とバイオイメージング”，羊土社，2000.
- 15) M. Han, X. Gao, J. Z. Su & S. Nie: *Nature Biotechnol.*, **19**, 631 (2001).