生体分子の1分子蛍光イメージング

船津 高志

東京大学大学院 薬学系研究科生体分析化学教室 (〒113-0033東京都文京区本郷7-3-1)

Single Molecule Imaging of Biomolecules

Takashi FUNATSU

Laboratory of Bio-Analytical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo,
7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033

(Received September 13, 2005)

Recent progress of the optical microscopy, especially the nearfield microscopy, has enabled us to study functions and interactions of protein molecules at single molecular level. Single molecule imaging has become an indispensable technique to life science research. On one hand, after the determination of the whole DNA sequences of human genome, the remained issues are elucidation of the functions of genes. Single-molecule imaging technique is expected to greatly contribute to such problems. Here, I review and survey the functional analysis of biomolecules by single-molecule imaging and manipulation.

Key Words: Fluorescence, Fluorescence microscopy, Evanescent field, Single molecule imaging

1. はじめに

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、その遺伝子産物(主にタンパク質)は、何時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。1分子蛍光イメージング法は、これらの問題を解明するための基盤技術を提供すると期待されている。既に、1分子蛍光イメージング法を用いて、1分子の酵素反応^{1,2)}、モータータンパク質の運動³⁻⁵⁾、タンパク質間相互作用^{6,7)}がイメージングされている。さらに、細胞表面での受容体とリガンドの結合⁸⁾などが研究されている。以下では、エバネッセント場を使った1分子イメージングの研究例を紹介する。

2. 1分子蛍光イメージングの原理

2.1 蛍光顕微鏡による1分子観察の歴史

タンパク質の大きさは光の波長よりもずっと小さいので、これを検出するには特別な工夫が必要である。生体分子に蛍光色素を結合させ、蛍光によって分子の存在が分かるようにしたのが蛍光顕微鏡法である。蛍光とは、色素分子が光のエネルギーを吸収して再び光を放射する現象であり、一般に吸収した光の波長よりも放射する蛍光波長の方が長くなる。そのため、色素をレーザー光で励起して、その励起光を光学フィルターで除いて蛍光の

放射光のみを検出するようにすれば、高感度な検出が可能になる。励起光が少しでも検出器に入ってくると蛍光は見にくくなる。1980年代になって、DNA⁹⁾やアクチン¹⁰⁾(筋タンパク質の一種)などの繊維状の巨大分子を、1分子レベルで蛍光顕微鏡観察できるようになったが、これらの観察は、生体分子に数百個の蛍光色素を結合させて、ようやく見えるものだった。1分子の蛍光色素は超高感度カメラならば検出可能な数の光を放出しているが、強い励起光をあてると様々な光学部品より蛍光が発生し背景光となるため、この背景光をいかにして少なくするかが1分子観測の最大の問題点であった。1990年代になって、顕微鏡部品の改良などによって、背景光の問題を解決することにより、1分子の蛍光観察が可能になった^{1,11)}。さらに、「エバネッセント場」を利用した局所励起を行うことにより、1分子の生体分子が酵素反応している様子¹⁾や運動している様子³⁾をイメージングすることが可能となった。

2.2 エバネッセント場による局所励起

伝播光を使って蛍光色素を局所励起するために、レーザー光を回折限界まで集光させる方法がとられる。しかし、この方法では励起する領域は波長の半分程度の広がりをもってしまう。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 (Fig. 1 (a)). 開口径50~200 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) とよばれる¹²⁾. 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、走査型トンネル顕微鏡や原子間力顕微鏡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という長所を持つ。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ため、生物学へ応用することは難しかった。

エバネッセント場を発生させる最も簡単な方法は、全反射を利用する方法である (Fig. 1 (b)). 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り、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、背景光が極めて小さく、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。

このように、全反射によるエバネッセント照明は、ガラス近傍のみを照明するのに有効であるが、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、全て一分子系の実験に移行できるわけではなかった。しかし、ガラス基板上に金属薄膜を蒸着し直径数十ナノメートル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 (Fig. 1 (c)). これを用いると、全反射型エバネッセント照明の場合よりも照射領域を千分の一にすることができる。このため従来の濃度の限界より千倍も高い濃度 (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できるようになった。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¹³⁾。

3. エバネッセント場蛍光顕微鏡を用いた 1分子イメージング研究

3.1 1分子計測の意義

まず、1分子計測することの意義を考察する。従来の生物科学研究では、生体分子の性質を、試験管内の多数分子の平均値として表してきた。例えば、濃度1 μ M、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

Fig. 1 The methods to generate evanescent field to excite the fluorescent molecule attached to a biomolecule. (a) Evanescent field is generated at the tip of fine needle of which aperture is smaller than the wave length of light. (b) Evanescent field is generated at the interface of glass and solution by total internal reflection. (c) Evanescent field is generated by microarrays of zero-mode wave guides.

場合、個々の分子の平均値からのずれを表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。このように、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が、分子のダイナミクスを研究することは困難である。生物分子モーターの化学・力学エネルギー変換のように、1分子が担っている2種類の反応のタイミングを明らかにするには、1分子ごとに計測しない限り不可能である¹⁴⁾。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は、「全ての分子は同様に振る舞う」という仮定を必要とする。しかし、1分子計測によって、生物分子モーターの力発生や、コレステロール酸化酵素などの酵素作用に履歴作用があることが分かり、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^{14, 2)}。1分子計測は技術的に難しいが、仮定のない明快な結論を導き出すことができるという長所がある。ただし、1分子計測を1回行うだけでは不十分で、複数回の測定を行い統計的な解析を必要とする場合が多い。生体分子の多くはATPの加水分解のエネルギーを利用して様々な仕事をしているが、ATPの加水分解によって利用できる自由エネルギーはわずか 10^{-19} J (1自由度あたりの熱エネルギーの40倍) しかない。このため、生体分子は、絶えず熱揺らぎの影響を受けており、確率論的に作用するという性質を持っている。したがって、1回測定しただけでは1分子の特性を十

分に決定したことにならず、繰り返し測定して統計処理をすることにより、はじめて生体分子の機能が明らかになる。

3.2 生体分子の運動を見る

次に、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 (Fig. 2)。タンパク質を蛍光色素で標識する場合、タンパク質の活性を保ったまま、いかにして特定部位に蛍光色素を結合させるかが問題となる。ここでは、蛍光色素Cy5を結合したピュロマイシン (Cy5-puro) を用いてタンパク質のC末端を蛍光標識する方法を紹介する⁴⁾。このためには、終止コドン欠いたキネシンDNAを用意し、Cy5-puro存在下で無細胞転写、翻訳を用いてキネシンを合成する。終止コドンがないため翻訳終了後、終結因子がリボソームに入らず、翻訳されたペプチド鎖がリボソームから解離できなくなる。しかし、ピュロマイシンのアミノ基がペプチジル-tRNAのペプチド鎖とtRNAとを結合しているエステル結合を攻撃し、より安定なアミド結合を形成してペプチド鎖をリボソームから解離する。このため、C末端にCy5-puroを共有結合したキネシンを得ることができる (Fig. 2 (a))。この方法を用いると、キネシンのDNAを加えてから2時間以内にCy5-puroキネシンを合成し、1分子機能アッセイすることが可能である。Fig. 2 (b)は、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、TIRFMで観察した結果である。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。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の精度で検出できる⁵⁾。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¹⁵⁾。

3.3 タンパク質分子間相互作用を見る

1分子イメージングによるタンパク質相互作用の研究例を、シャペロニンによるタンパク質折りたたみ機構を例として解説する。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れたたまり、ある立体構造を形成する必要がある。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。様々な分子シャペロンの中で、最も研究が進んでいるのが大腸菌のGroELである。GroELは7つのサブユニット(分子量57 k)からなる「かご」状のリングが2層に重なった構造をしている。GroELにATPが結合すると補助因子である「ふた」状のGroESと結合して巨大な空洞をもった複合体を形成する。この空洞の中でシャペロニンの基質となる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。GroELをガラス基板の固定し、別の蛍光色素Cy3で標識したGroESを溶液に加えGroELと結合・解離する様子を観察した (Fig. 3 (a))。GroESのブラウン運動は非常に早いので、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。従って、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 (Fig. 3 (b))。GroESの結合時間を解析した結果、GroESは、ある中間体を経てから解離する二段階反応であり、それぞれの反応の時定数は3秒と5秒と見積もられた (Fig. 3 (c))。次に、この中間体がどのような役割を果たしているのか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れたたみを1分子イメージングした。このために、変性した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の蛍光が現れた。この

Fig. 2 Single molecule imaging of kinesin moving along a microtubule. (a) A schematic drawing of the procedure for synthesizing and analyzing function of Cy5-puro-kinesin. (b) Movement of single Cy5-puro-kinesin molecules along a microtubule. Fluorescence micrographs of a microtubule (top panel) and serial micrographs of Cy5-puro-kinesin molecules (time in seconds). Scale bar, 5 μ m.

Fig. 3 Single-molecule imaging of chaperonin GroEL-GroES dynamics. (a) Schematic drawing of the experiment. (b) Fluorescence images of single GroEL and GroES molecules. (c) Histogram of the duration of 'on-time'. The solid line was fit to the data by least squares fitting.

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タンパク質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⁷⁾。

3.4 酵素反応を見る

1分子の蛍光分子が見えるので、蛍光色素で標識した任意の生体分子をイメージングできる。ATPなどの基質に蛍光性物質を結合させる技術が平塚らによって考案され、TNP-ATP¹⁶⁾、MANT-ATP¹⁷⁾が合成され、その有効性が示されている。私たちは、ATPに蛍光色素Cy3を結合させたCy3-ATP (Fig. 4 (a))を用いて、筋肉の生物分子モーターであるミオシン1分子が1分子のATPを加水分解している様子を直接イメージングした¹⁾。ここで、1分子のATPase反応のイメージング法の原理について解説する (Fig. 4 (b))。まず、ガラス表面上にCy5で蛍光標識したミオシン分子を

固定し、ミオシン分子の位置を確認する。次に、Cy3-ATPを加える。エバネッセント照明では、ガラス基板から約150 nmの距離にいる蛍光色素しか励起されない。ミオシンに結合していないCy3-ATPはブラウン運動をしているため、たとえ照射領域に入ったとしても蛍光スポットとして観察されず背景光となるだけである。Cy3-ATPがミオシンに結合するとブラウン運動が制限され、初めて輝点として観察できるようになる。Cy3-ATPがミオシン分子上で加水分解され、Cy3-ADPが解離すると再び暗くなる。この光の点滅によってATPのターンオーバーをイメージングする。

1分子イメージングと光ピンセットによるナノ分子操作を組み合わせることにより、生物分子モーターの化学反応と力学反応を1分子レベルで同時計測した¹⁴⁾。このために、まずアクチンフィラメントの両端を直径1 μmのマイクロビーズに結合させ、光ピンセットで捕捉した。続いてアクチンフィラメントとミオシンを相互作用させ、ミオシンが発生する数pNの張力をビーズの数nmの変位から検出した。一方、ミオシンのATPaseはCy3-ATPの蛍光強度変化から求めた。その結果、ヌクレオチドの放出から数十から数百ミリ秒遅れて力を発生する事例が確認された。この現象は、生物分子モーターの力発生がATPの加水分解あるいは、無機リン酸やADPの解離と共役しているとする今までの説では説明できない。この結果は、蛋白質がATPの加水分解で受け取った自由エネルギーを内部に貯めておき、必要なタイミングを計って仕事をするという高度な機能を持っていることを示している。

以上の研究は、基質に蛍光色素を結合させて酵素反応をイメージングしたが、酵素が蛍光を有する場合は、この蛍光を利用して1分子イメージングすることが可能である。コレステロール酸化酵素は補酵素としてFAD (flavin adenine dinucleotide)を結合している。コレステロールの酸化に伴ってFADが還元されてFADH₂となり、自然酸化によりFADに戻る。FADは蛍光を発するが、FADH₂は蛍光

Fig. 4 Imaging of enzymatic reactions. (a) Structure of Cy3-ATP. (b) Schematic drawing of the experiment. (c) Structure of fluorescein di-β-D-galactopyranoside. It emits fluorescence on cleavage of sugars indicated by arrows by β-galactosidase.

を出さないで、この性質を利用して酵素反応が1分子イメージングされている²⁾。解析の結果、酵素反応が終了した直後の1秒くらいの間は、次の反応が速やかに進行することが示された。ミオシンやコレステロール酸化酵素に見られる履歴効果は、1分子計測によって初めて明らかにされた現象である。

酵素と蛍光性基質を直接1分子イメージングする他に、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。この方法では、光透過性が高く生体試料と相性の良いPDMSとよばれるシリコンゴム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¹⁸⁾。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 (Fig. 4 (c))。 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。

4. 新しい蛍光標識材料

4.1 蛍光タンパク質

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が生物の体内で作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¹⁹⁾。GFPと様々なタンパク質との融合タンパク質が作られ、ついに、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るようになった。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。

4.2 量子ドット

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。CdSeをZnSで被覆した量子ドットは既に市販されている。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ID化が可能である²⁰⁾。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。

5. おわりに

量子ドットや微小開口列を用いた1分子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とナノテクノロジーが融合することにより、より大きな発展が期待される。

参考文献

- 1) T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, and T. Yanagida: *Nature* **374** (1995) 555.
- 2) H. P. Lu, L. Xun, and X. S. Xie: *Science* **282** (1998) 1877.
- 3) R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada, and T. Yanagida: *Nature* **380** (1996) 451.
- 4) J. Yamaguchi, N. Nemoto, T. Sasaki, A. Tokumasu, Y. Mimori-Kiyosue, T. Yagi, and T. Funatsu: *FEBS. Lett.* **502** (2001) 79.
- 5) A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, and P. R. Selvin: *Science* **300** (2003) 2061.
- 6) H. Taguchi, T. Ueno, H. Tadakuma, M. Yoshida, and T. Funatsu: *Nat. Biotechnol.* **19** (2001) 861.
- 7) T. Ueno, H. Taguchi, H. Tadakuma, M. Yoshida, and T. Funatsu: *Mol. Cell.* **14** (2004) 423.
- 8) Y. Sako, S. Minoghchi, and T. Yanagida: *Nat. Cell. Biol.* **2** (2000) 168.
- 9) K. Morikawa and M. Yanagida: *J. Biochem. (Tokyo)* **89** (1981) 693.
- 10) T. Yanagida, M. Nakase, K. Nishiyama, and F. Oosawa: *Nature* **307** (1984) 58.
- 11) I. Sase, H. Miyata, J. E. Corrie, J. S. Craik, and K. Kinoshita, Jr.: *Biophys. J.* **69** (1995) 323.
- 12) E. Betzig and R. J. Chichester: *Science* **262** (1993) 1422.
- 13) M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, and W. W. Webb: *Science* **299** (2003) 682.
- 14) A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka, and T. Yanagida: *Cell.* **92** (1998) 161.
- 15) R. Yasuda, H. Noji, M. Yoshida, K. Kinoshita, Jr., and H. Itoh: *Nature* **410** (2001) 898.
- 16) T. Hiratsuka: *Biochim. Biophys. Acta.* **453** (1976) 293.
- 17) T. Hiratsuka: *Biochim. Biophys. Acta.* **742** (1983) 496.
- 18) Y. Rondelez, G. Tresset, K. V. Tabata, H. Arata, H. Fujita, S. Takeuchi, and H. Noji: *Nat. Biotechnol.* **23** (2005) 361.
- 19) M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher: *Science* **263** (1994) 802.
- 20) M. Han, X. Gao, J. Z. Su, and S. Nie: *Nat. Biotechnol.* **19** (2001) 631.