

# 1個の生体分子の運動を観る

原田慶恵

財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・副参事研究員

1個の生体分子に1分子の蛍光色素で目印をつける。顕微鏡の感度を上げる工夫をする。新たな光源を使う。そしてついに、個々の生体分子が働いているときの動きが見えるようになった。

われわれの体の中にはタンパク質やDNAなど多種多様な生体分子が存在し、それぞれが役割分担に従って正しく機能することで、生命活動は営まれている。生命現象を根本から理解するためには、まず、「個々の分子がどのようなメカニズムで機能しているのか」を明らかにすることが非常に重要である。そのための最も直接的な方法は、生体分子が機能しているようすを実際に目で見てしまうことであり、20年ほど前から実験が始まった。

しかし、大きさが数十nm<sup>\*1</sup>しかない生体分子を「観る」ことは簡単ではない。光学顕微鏡では最小でも数百nm程度のものでしか見えない<sup>\*2</sup>。電子顕微鏡ならこれより小さいものが見えるが、試料を真空中で観察する方式のため、生体分子を見るには適さない。生体分子が働くようすを見るには、生体中と似た水溶液の中で観察する必要があるからだ。

そこで、水溶液の観察に適した光学顕微鏡で生体分子を観察するために、生体分子に目印をつけることが考えられた。たとえば、直径約1μm<sup>\*3</sup>のビーズや、多数の蛍光色素で明るく光らせた抗体のかたまりなどを生体分子に結合させて観察する方法が開発された。これらの方法を使えば、市販の顕微鏡で手軽に生体分子の動きを観察できる。

しかし、生体分子にその数百倍もの大きさの目印をつければ、生体分子の機能

や動きが損なわれることも多い。そこで、われわれは今から10年ほど前に、たった1分子の蛍光色素が出す光を蛍光顕微鏡で観察する方法を開発し、1個の生体分子に蛍光色素1分子をつけてその動きを観察することに成功した。「目印」の大きさの影響を受けずに、生体分子の動きを見ることができるようになったのである。

## 1分子の蛍光色素のイメージング

われわれは、蛍光色素1分子を観察することは可能なのかというところから出発した。調べてみると、蛍光顕微鏡下で蛍光色素をレーザーなどの比較的強力な光源によって励起すると、1個の分子が市販の高感度カメラで見るのに十分な明

るさの光を放つことがわかった。蛍光色素1分子の観察が難しいのは、光学部品が励起光を受けて発する蛍光や、水による散乱光、励起光のもれなどが明るい背景光となり、あたかも昼間に星を観察するような状態になってしまうからである。

そこで、われわれはまず、強力な光で励起しても退色しにくい蛍光色素を探した。さまざまな蛍光色素の性質を調べた結果、シアニン色素のCy3が最適であるとわかったので、この色素に適した励起波長、蛍光波長を決定した。次に、蛍光色素が発する光をできるだけ効率よく集め、背景光をできるだけ減らすように、蛍光顕微鏡の対物レンズ、ミラー、フィルターなどを慎重に選んだ。さらに改良

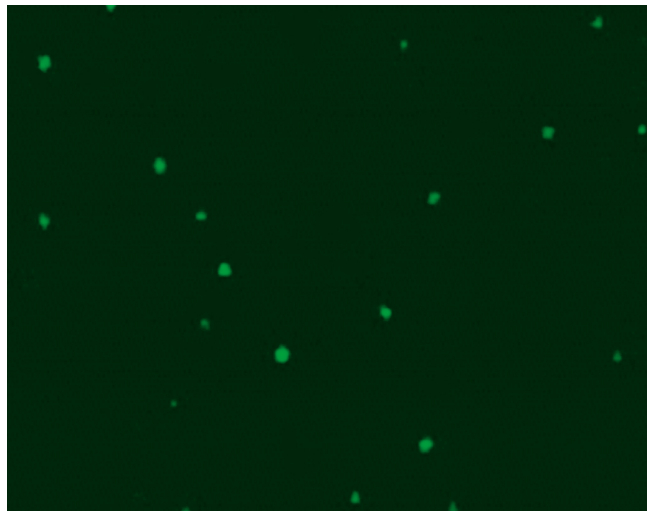


図1 蛍光色素Cy3を結合させた酵素タンパク質分子（グルタチオントランスフェラーゼ）をエバネット照明で観察した蛍光顕微鏡像。個々の蛍光スポットが1分子のタンパク質。白黒カメラで撮影した写真に画像処理で着色した。写真提供：貴家康尋／原田慶恵

を加え、背景光を従来の50分の1程度に減らすことができた。観察感度を上げるために、光を増幅するイメージインテンシファイアと高感度カメラを組み合わせ、1分子のCy3がどうにか観察できるようになった。

しかし、生体分子の動きを数十秒間にわたって追跡するためには、さらに背景光を減少させ、蛍光色素1分子をより明るく観察できるようにする必要がある。そこでわれわれは、蛍光顕微鏡に、これまでの照明とはまったく異なる「エバネッセント光」を導入した。

水溶液をスライドガラスに載せ、励起用のレーザーをある角度以上の入射角で下からあてると、レーザーはスライドガラスと水溶液の界面で全反射されるが、そのとき、水溶液側にわずかに光がしみ出す。これがエバネッセント光で、岡本先生の解説にある「近接場」と似た光である。このエバネッセント光は界面からせいぜい150nmの範囲までしか届かないので、この範囲にある蛍光色素しか励起

されない。そのため、この範囲外の水溶液の散乱や蛍光色素による背景光を抑えられる。また、照射系と結像系が完全に分離されているので、光学部品が発する背景光も最小に抑えることができる。

この照明法により、背景光は市販の蛍光顕微鏡の2000分の1以下に減少し、蛍光色素1分子を明るい輝点として数分間安定に観察できるようになった(図1にエバネッセント照明による観察例を示す。エバネッセント光のイメージは、図2でおわかりいただけるかと思う)。

### モータータンパク質1分子の滑り運動を見る

この1分子イメージング顕微鏡を使って、1分子のタンパク質が実際に機能しているところを観察した。タンパク質分子は、筋収縮や細胞の運動、細胞内物質輸送などさまざまな運動を担っている。なかでも、アデノシン三リン酸(ATP)などの化学エネルギーを使って回転運動や滑り運動などを行うタンパク質分子群を、「生物分子モーター」と呼ぶ。これ

らのモータータンパク質分子はダイナミックに動いて働くので、1分子イメージングの手法を使って研究するのに適している。

そこで、その一つであるキネシン分子の動きを観察することにした(図2)。キネシンは神経細胞の軸索内でミトコンドリアやシナプス小胞前駆体などの輸送を行う。モーターの機能をもった部分(2個の丸い部分)と、細長い尾部からなる。尾部の先に輸送する「荷物」を結合し、ATPの加水分解エネルギーを使ってモーターの部分で微小管(タンパク質でできた細長いレール)の上を滑る。

この滑り運動を観察するにはまず、キネシン分子に蛍光色素を結合させなければならない。そのために、遺伝子工学的手法を用いて、尾部の端に反応性の高いアミノ酸(システイン)を導入した。この変異キネシンを大腸菌につくらせて精製し、導入したシステインにCy3を結合させた。一方、Cy5という別の蛍光色素を結合させた微小管をガラス表面にくっ

図2 キネシン1分子の滑り運動観察の模式図

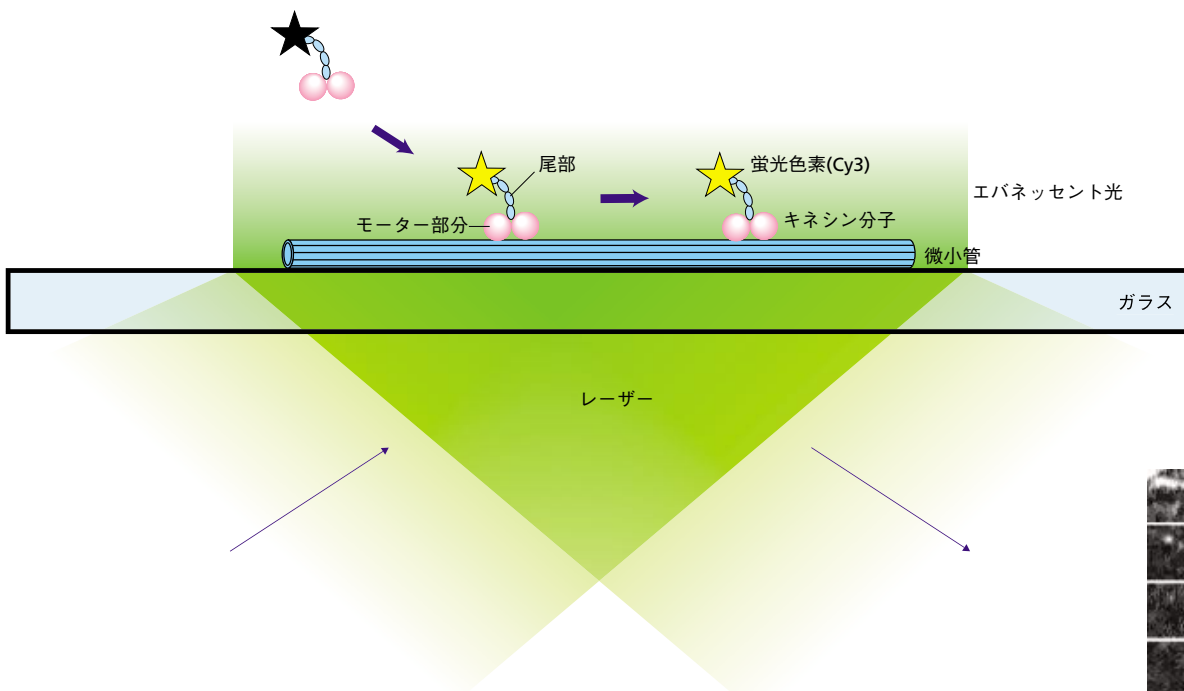
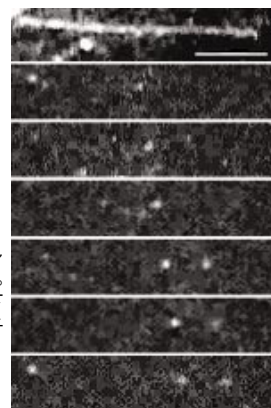


図3 キネシンの滑り運動。いちばん上の像はCy5を結合させた微小管。スケールバーは5 μm。2番めから下は、Cy3を結合させたキネシン分子が微小管に沿って滑り運動するようすを1秒ごとに撮影した像。写真提供：武藤悦子/原田慶恵



けてその位置を確認しておく。

ここに、ATPを含む溶液とともにCy3キネシンを加え、エバネッセント照明蛍光顕微鏡で観察すると、個々のCy3キネシン分子が微小管上を一方向に滑り運動するようすが観察された(図3)。滑り速度はおよそ0.5  $\mu\text{m}$ /秒で、多分子を使った方法で観察された速度とほぼ同じであった。これは、タンパク質1分子が機能するところを直接観察した初めての例である。

### 神経細胞の成長機構を解明する

キネシンの観察は細胞外で行ったものだが、最近では細胞膜上や細胞内の生体分子の1分子イメージングが行えるようになってきた。われわれは、神経細胞の成長機構の解明に1分子イメージング技術を応用することを試みている。

受精卵が胚から個体になるとき、神経細胞はそれぞれ決まった標的細胞に向かって軸索を伸ばす。遠く離れた標的細胞まで軸索をガイドするのは、軸索の先端にある成長円錐である。成長円錐は神経成長因子(NGF)存在下では活発に運動し、1時間に数十  $\mu\text{m}$ の速さで前進する。成長円錐が微量のNGFに应答する仕組みを明らかにするためには、成長円錐膜上にあるNGF受容体にNGF分子が結合するようすを観察する必要がある。そこで、ニワトリの神経細胞の成長円錐に、Cy3を結合させたNGF(Cy3 NGF)を投与し、蛍光顕微鏡で観察することにした。

先に述べたエバネッセント光はガラス表面のごく近くにしか届かないので、細胞のように厚みのある試料での1分子観察には使えない。そこでわれわれは、水銀ランプからの光を光ファイバーで均一にし、これを光源として試料面近傍を明るく照らす「クリティカル照明法」を用いた。この方法で観察を行うと、溶液中のCy3 NGFは速いブラウン運動をするため観察されず、成長円錐膜上の受容体に結合したCy3 NGF分子のみが観察できる。成長円錐は厚さがわずか数百nmなので、思いの外きれいな1分子蛍光像を観察することができた(図4)。

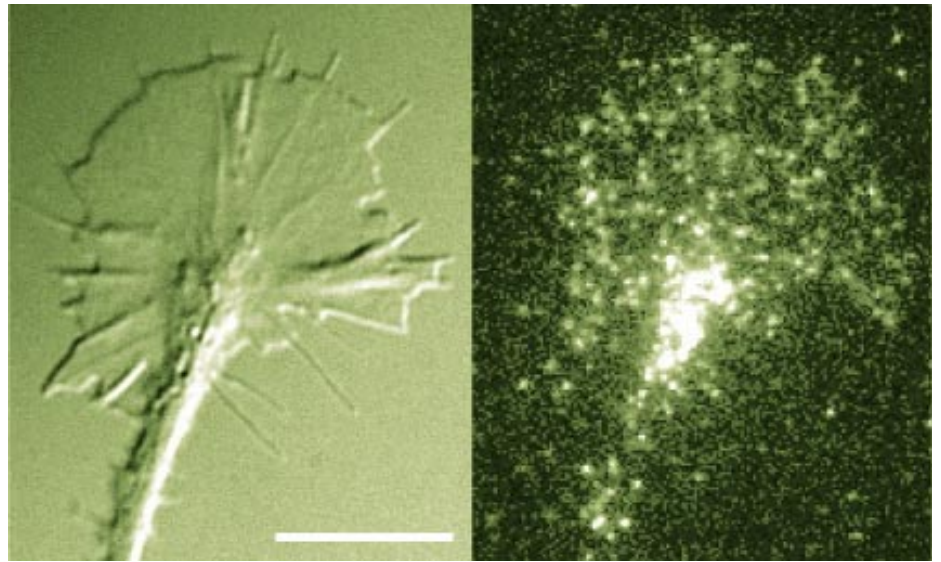


図4 Cy3を結合させた神経成長因子(Cy3 NGF)を投与したニワトリ胚背根節神経細胞の神経成長円錐の微分干渉顕微鏡像(左)と蛍光顕微鏡像(右)。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ 。Cy3 NGFは葉のように広がった膜上全体に結合している。また、成長円錐基部に非常に多く集積している。白黒カメラで撮影した写真に画像処理で着色した。写真提供: 谷知己/原田慶恵

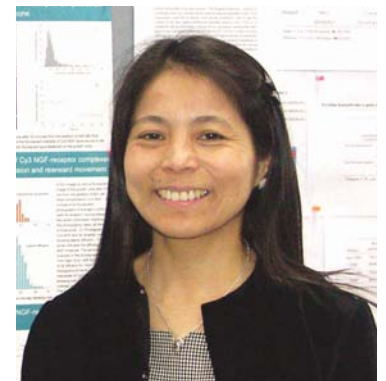
培養溶液にCy3 NGFを加えると成長円錐は前進運動を開始する。このとき、成長円錐膜上には多数のCy3 NGFが結合しているのが観察された。Cy3 NGF分子一つ一つの動きを追跡した結果、受容体と結合したNGFは、膜上に広がって運動した後、成長円錐の周縁から内側に向かい、成長円錐と神経軸索との結合部に集まって細胞内に取り込まれることが示唆された。およそ40分子のNGFが結合すると成長円錐が運動を開始することなども明らかになった。今後は、NGFが結合した受容体の変化も同時に可視化し、さらに詳しく機構を解明したいと考えている。

### 生命現象の1分子イメージング

以上簡単に1分子イメージング技術とその応用例を紹介した。ここで紹介した技術は、タンパク質間の相互作用、タンパク質とDNAの相互作用など、あらゆる生体分子の機能を1分子レベルで研究するのに応用できる。現在、エバネッセント照明を組み込んだ蛍光顕微鏡が市販されており、手軽に1分子蛍光観察ができるようになった。また、カメラの技術の進歩によって、10年前とは比べものにならないほどきれいな1分子蛍光像を観

察できるようになった。これからも次々と新しい技術が開発され、遠からず生きた細胞内の情報伝達の3次元イメージングができるようになるだろう。

- \*1 1 nm (ナノメートル) =  $10^{-9}\text{m}$  (10億分の1 m)
- \*2 p.10も参照。
- \*3 1  $\mu\text{m}$  (マイクロメートル) =  $10^{-6}\text{m}$  (100万分の1 m)



原田慶恵 (はらだ・よしえ)  
博士課程の途中まで「ゾウリムシで何かおもしろい研究を」と試みていたが、丸ごとの生き物を相手にするのは手に負えず、方向転換した。筋収縮の際のタンパク質分子の機能の研究から、個々のタンパク質分子が機能しているところを直接見てしまおうということになって現在に至る。DNAの端にビーズをつけ、DNA分子モーターの動きの観察も行っている。平成16年度には、総合研究大学院大学先端科学研究科の非常勤講師として講義を行った。写真提供: 原田慶恵