

## 細胞内シグナル伝達反応の1分子イメージング解析



技術解説

宮永之寛\*, 上田昌宏\*\*

Single-molecule imaging analysis of intracellular signaling events

Key Words : TIRFM and single-molecule visualization

### 1. はじめに

タンパク質などの生体分子1個を水溶液中で可視化し、それらが働く様子を実時間観察する技術を1分子イメージング法(single-molecule imaging techniques)とよぶ。1995年に柳田ERATOプロジェクトにおいて、船津高志氏(現在、東京大学)らによって世界に先駆けて開発され、分子モーターや酵素などの動作機構に関する新たな知見が数多く得られてきた<sup>1-3)</sup>。また、この技術を細胞生物学・医学研究へと応用するために、1998年頃から生きた細胞の中で生体分子1個をイメージングする顕微鏡技術の開発が進められた。当時、大阪大学・医学系研究科におられた佐甲靖志氏(現理化学研究所)を中心として、筆者の一人(上田)も加わり、顕微鏡光学部品、細胞調整法を徹底的に見直すことにより、2000年頃に細胞内1分子イメージング法を確

立した<sup>4-7)</sup>。これにより、生理活性物質リガンドが細胞へ結合する様子や情報伝達分子の二量体化、複合体形成、リン酸化、拡散、構造変化などの細胞内シグナル伝達の素過程を生きた細胞内において1分子レベルで可視化することが可能になった。電子顕微鏡を用いた観察では、細胞を生きたまま観察することが出来ないが、細胞内1分子イメージング法では、生きた細胞内で分子本来の挙動を分子1個ずつ観察することができる。

1分子計測法には次のような利点がある。一般に、生体分子の特性を調べるときには、多数の分子の集団的挙動を計測する。このため、計測によって得られる特性は、分子集団として平均化されたものになる。一方、1分子計測法では、分子の特性を1個ずつ計測するために、その分子集団の平均的挙動が分かるだけでなく、分子ごとの確率的な振るまいや集団としてのバリエーション・ゆらぎの情報が得られる。また、分子の反応過程を追跡する場合、従来の方法では多数の分子集団の反応を何らかの工夫により同調化させる必要があるが、これは一般的に言って簡単ではない。ところが、1分子計測では、分子反応の開始点から終了点までの時系列データを1分子ごとに得られるために、多数の分子を同調化させることなく、反応過程に関する情報を得ることができる。さらに1分子計測では、観察対象の生体分子を必ずしも分離精製する必要はなく、生きた細胞の中で、その特性を調べることができる。細胞は均一な袋ではなく、内部に複雑な構造をもつために、個々の分子にとっては、まわりの微小環境が少しずつ異なっている。細胞内1分子イメージング法では、生体分子の特性を微小環境の違いや細胞状態の変化と対応づけて計測することができる。分子集団を扱う従来の手法では得ることが出来なかったような分子ごとの反応過程の違いが見つかってきており、細



\* Yukihiro MIYANAGA

1979年4月生

2004年大阪大学生命機能研究科生命機能専攻修士課程修了

現在、大阪大学生命機能研究科・ナノ生体科学講座ソフトバイオシステム研究室、博士課程学生、修士(工学)、生物物理学

TEL 06-6879-4632

FAX 06-6879-4632

E-mail: yukihiro@phys1.med.osaka-u.ac.jp



\*\* Masahiko UEDA

1966年3月生

1995年大阪大学理学研究科生理学専攻現在、大阪大学大学院生命機能研究科、特任教授、博士(理学)、生物物理学・細胞生物学

TEL 06-6879-4632

FAX 06-6879-4634

E-mail: ueda@phys1.med.osaka-u.ac.jp

胞の振る舞いを理解する上で重要な知見が得られてきている。

本稿では、細胞内1分子イメージングによく用いられる全反射蛍光顕微鏡法 (Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM)) について解説する。また、その顕微鏡法を細胞内情報処理研究に適用した実験例にふれる。細胞内1分子イメージング法は情報処理研究に対して新たな手段を与えると共に、生物の情報処理の巧みさや不思議を露わにする魅力的な技術である。

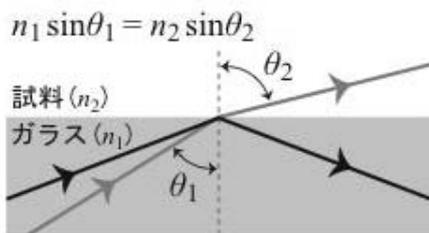


図1 スネルの法則

## 2. エバネッセント光と蛍光1分子イメージング

全反射蛍光顕微鏡法 (TIRFM) は、ガラスと試料との界面で形成されるエバネッセント光を利用することでガラス近傍の蛍光分子を1分子レベルで観察することができる顕微鏡法である<sup>8)</sup>。まず、エバネッセント光について説明したい。図1に示したように、光がガラス側から入射すると、ガラスと試料の屈折率に応じて屈折し、試料側に放射される(スネルの法則)。この放射は入射光の角度( )が比較的小さい場合におこるが、ある臨界角以上で入射した場合には、光はガラスと試料との界面で全反射し、試料側へ放射されない。このとき、界面には入射光による振動電場が形成されるが、これがエバネッセント光と呼ばれる。エバネッセント光の進行方向は反射面に対して平行な向きとなり、垂直方向には伝搬しないため、その光強度が反射面から垂直方向に離れるに従って指数関数的に急激に減衰する性質をもつ(図2)。その性質を利用することで、試料のガラス近傍のみを照明することができる。試料中に蛍光色素があると、ガラス近傍にある蛍光色素のみが励起され、ガラス表面から離れたところにある蛍光色素は光らないために、真っ暗の背景の中でガラス近傍の色素だけが蛍光を発することになる。ちょうど夜空で星が光っているところを想像していただ

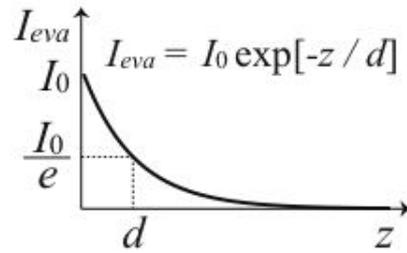


図2 エバネッセント光の強度と全反射面からの距離

くとよい。背景光がほとんど無いために、蛍光分子1個が発する微弱な蛍光シグナルでも十分に可視化することができる。

エバネッセント光の強度  $I_{eva}$  は反射面からの距離  $z$  の関数として以下の式に従う。

$$I_{eva} = I_0 \exp[-z/d]$$

この式で、 $I_0$  は  $z=0$  つまり反射面でのエバネッセント光の強度である。また  $d$  は浸み込みの深さで、光の強度が  $1/e$  になる距離である。この  $d$  は以下の式で表される。

$$d = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}}$$

ここで、 $\lambda$  は入射光の波長を表し、 $n_1$  と  $n_2$  はそれぞれガラスと試料の屈折率で、 $n_1 = 1.52$ 、 $n_2 = 1.33$  (水の場合) となる。試料が細胞の場合は  $n_2 =$  約 1.37 である。また  $\theta$  は入射角で、入射光と反射面の垂線とがなす角である。仮に、 $n_1 = 1.52$ 、 $n_2 = 1.33$ 、 $\lambda = 532 \text{ nm}$ 、 $\theta = 64^\circ$  としたとき、 $d = 132 \text{ nm}$  になる。つまり数百ナノメートル程度で励起光が数分の1になる。励起光強度を調節すれば、ガラス表面近傍の蛍光分子のみ励起することができる。

## 3. 全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) の構成

TIRFMには主にプリズム型と対物レンズ型の2種類があり、目的に応じて使い分けられる(図3)。プリズム型TIRFMは背景光をできるだけ減らしたい

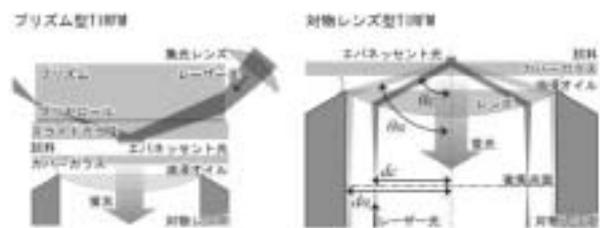


図3 プリズム型TIRFMと対物レンズ型TIRFM

場合や、1分子蛍光分光、1分子FRET、高精度力学測定との同時計測など、複雑な光学系に組み込む場合によく用いられる。対物レンズ型TIRFMは試料の厚みに制限がなく、ガラスに接した面を観察することができ、生細胞などの厚みのある試料の観察に用いられる。また、試料の上側が空いているためマイクロインジェクションやマニピレーション、電気生理学的手法などと組み合わせることが比較的容易である。実際、対物レンズ型TIRFMは生体分子1個を捉まえて操作するナノマニピレーション技術と蛍光1分子イメージング技術を組み合わせるために、徳永万喜洋氏（現在、国立遺伝学研究所）らによって開発された<sup>9)</sup>。以下では細胞内1分子イメージングに多用される対物レンズ型TIRFMについて説明する。

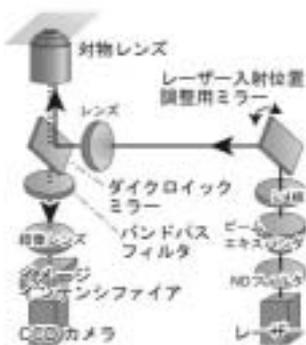


図4 対物レンズ型TIRFMの構成

図4に我々が使用している対物レンズ型TIRFMの構成を示した。対物レンズ型TIRFMの光学系の特徴は、試料への励起光照明と試料が発する蛍光の集光を一つの対物レンズで行うところにある。入射レーザー光の焦点を対物レンズの後焦点面の中心に入射させると、従来から細胞生物学などでよく使われている落射照明法の顕微鏡となる。入射レーザーの焦点を対物レンズの周辺部に移動させることで、ガラス-試料界面でのレーザー入射角を変更できる。入射角が臨界角以上になると全反射が起こり、界面上にエバネッセント光が発生する。つまり、入射光の位置を変えるだけで、落射照明と全反射照明を切り替えることができ、落射照明用の顕微鏡を少し改造するだけで、全反射照明の顕微鏡になる。我々の顕微鏡では図4のミラーの角度を変更することで入射位置を変えている。図3の右図にあるように、全反射照明は入射レーザー光の焦点を $dc$ から $d$ の間

に入射した場合に実現できる。 $dc$ と $d$ の位置に入射したレーザーはそれぞれ入射角 $c$ と $d$ でガラス-試料界面に入射する。 $c$ はガラス-試料界面での臨界角であり、 $n_1 \sin c = n_2 \sin 90^\circ$ である。ここで $n_1 \sin c = NA$ である。ここで $NA$ は対物レンズの開口数である。 $c$ は対物レンズが集光できる最大の角度であるが、同時に入射レーザー光の入射角の最大値を決める。全反射は入射角が臨界角 $c$ 以上のときにおこるので、 $c$ より大きい $d$ をもつレンズが必要とされる。従って、対物レンズの開口数 $NA$ が試料の屈折率 $n_2$ 以上でなければならない。細胞の屈折率は約1.37なので、それ以上の $NA$ を持つ対物レンズが必要である。現在では $NA1.45$ の対物レンズが市販されており、このレンズで十分な1分子画像が得られる。全反射面でのエバネッセント光の強度は入射角に依存し、 $c$ と $d$ の間で2倍程度変化する。これにより蛍光色素の蛍光強度・褪色時間も変化するため、実験の性質によっては測定毎の入射光の角度に気を付ける必要がある。入射レーザーの角度は図5の方法で測定することができる。

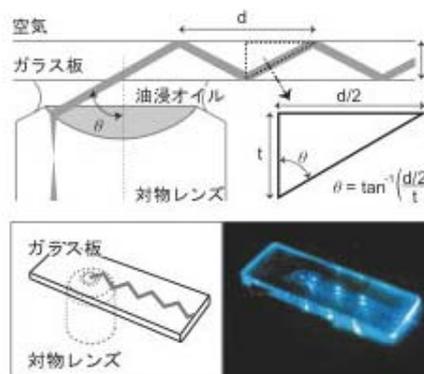


図5 レーザー入射角の測定。ガラス板内部でレーザーを反射させ、反射位置に現れるスポット間の距離から角度を測定する。

試料から発せられた蛍光は同じ対物レンズにより集光される。光学系に組み込まれた各種のフィルター、ダイクロイックミラーの選択は慎重に行う必要がある。シグナルとなる蛍光の減損を最小限にし、ノイズの除去が最大になるように選択する。細胞はしばしば自家蛍光を持ち、細胞の種類によってその波長が異なるので、研究対象にあわせて、光学系を調整した方がよい。蛍光像はイメージンシファイアを用いて増幅し、高感度のCCDカメラで取得する、画像はコンピュータのハードディスクに記録さ

れる．時間分解能は通常33ミリ秒（ビデオレート）程度であるが，数ミリ秒までは上げることが出来ている．

#### 4. 細胞内1分子イメージングの実験例

細胞の表面膜は細胞が環境からのシグナルを処理し，細胞内部へと伝達する入口となっている．細胞内情報伝達反応の多くがこの細胞膜上で起こる．TIRFMを用いれば，細胞膜上での生体分子の挙動を捉えることができる．我々はこの細胞内1分子イメージング法を用いて，刺激の受容から細胞運動の制御に至る情報伝達の仕組みを調べている<sup>6, 10-12</sup>．以下にその一例を示す．

細胞に蛍光色素で標識したリガンドの溶液を加えると，蛍光リガンドが細胞膜上の受容体に結合する様子を観察することができる（図6）．溶液中を自由に拡散する蛍光分子は拡散が速いため，輝点として認識できない．蛍光分子が細胞に結合することによって拡散が制限されたときのみ輝点として観察される．蛍光リガンドが受容体から解離すると，細胞膜上の輝点は消える．受容体はリガンドと結合し複合体を形成することにより環境からの信号を細胞内に伝えるので，細胞膜上の輝点の挙動を解析すれば，受容体が信号を伝える実態について情報を得ることができる．

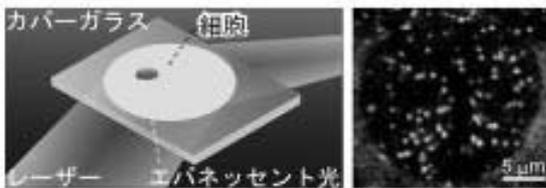
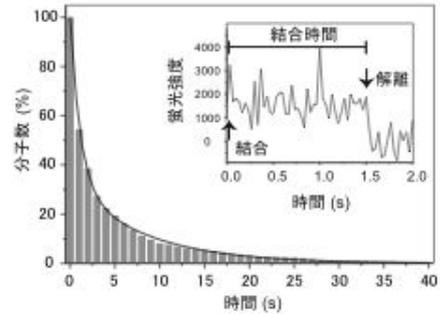


図6 対物レンズ型TIRFMによるリガンド結合の細胞内1分子イメージング（左）．白い点が蛍光リガンド1分子（右）．

我々は蛍光リガンドが受容体に結合している時間を計測することで，リガンドと受容体の解離速度を生きた細胞上で計測することに成功した（図7）<sup>6</sup>．その結果，細胞上の場所によって解離速度が異なることがわかってきた．これは細胞膜上で均一と思われていた受容体の性質が空間的に制御されていることを示す初めての結果で，従来の方法では検出不可能である．ここでは詳細に述べないが，こうした受容体の特性変化能は，細胞がゆらぐ環境下で柔軟な環境認識を行うために重要であることが分かっている．

また，細胞に結合した蛍光リガンドの数を数えることで，活性化した受容体の数が時間的にどのような

結合時間分布



結合数の経時変化

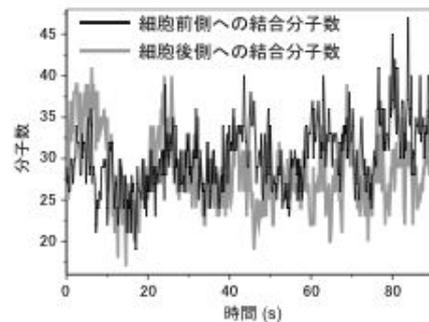


図7 リガンド結合の1分子イメージング解析．（上）結合時間分布．指数関数的に減衰する．（inset）リガンド1分子の結合から解離までの蛍光強度変化．（下）リガンド結合数の時系列データ．結合数は時間と共にゆらぎ，ときに前後で逆転する．

に変化するのかが直接計測することができた（図7）<sup>12</sup>．結果，細胞へのリガンド結合の空間的・時間的パターンは一定したものではなく，ゆらぎを伴うことがわかった．これは，リガンドと受容体の結合・解離反応が確率過程であることを反映しており，あたり前の結果ではあるが，細胞内1分子イメージングにより初めて実測することができた．我々が研究対象としている細胞は，このリガンドの空間的・時間的結合パターンを入力信号とし，リガンド濃度の高い方向へと移動する性質を持っている．これは走化性あるいは化学走性と呼ばれる生理現象で，神経細胞や白血球細胞が多細胞体の中で適切な位置を占めるのに重要であることが知られている．リガンドの結合パターンがゆらぐということは，細胞が受け取る外部環境シグナルが不安定であることを意味する．実際，環境にあるリガンドの濃度勾配が一定であっても，細胞膜に結合したリガンドの空間的パターンが濃度勾配の方向に対して逆転している場合が観察されている．しかしながら，そのような状況下でも，

細胞は濃度勾配の方向が分かり、安定した走化性応答を示す。確率的に作動する分子からなる情報処理システムが、どのような仕組みでゆらぐ環境からノイズな信号を受容し、処理し、伝達するのか、またそのシステムがゆらぎに対してどのような仕組みで安定性・強靭性を獲得しているのかはまだ分かっていない。これは細胞生物学に新しい問題を提起している。

## 5. おわりに

細胞内の情報処理の特徴は、シグナルの加工や伝達過程にノイズが伴うことである。ノイズを排除することで成立している人工機械の情報処理・情報伝達とは異なる原理が働いている可能性がある。細胞内の情報処理は蛋白質から構成されるナノメートルサイズの分子機械が主要な役割を担う。個々の分子機械は熱ゆらぎによる無秩序な攪乱にさらされることで機能を果たすが、シグナル伝達はそのことで不可避免的に確率的性質を持つことになる。ノイズを伴うプロセスがシグナルを適切に加工し伝達する仕組みを解明することは、細胞内情報処理研究における重要な課題である。これまでの研究から、走化性の情報処理では「ノイズ処理」の仕組みが決定的に重要であることが分かってきている。我々が開発した細胞内1分子イメージング法を用いて、刺激の受容から細胞運動の制御に至る情報処理過程を細胞内で1分子イメージングすることにより、熱ゆらぎの影響を受けながら作動している情報伝達分子の振舞いを明らかにすることを目指している。また、本稿ではふれなかったが、細胞内の確率的分子情報処理(Stochastic biomolecular computation)の理論的解析もすすめている。こうした1分子レベルでの精密実験と理論・計算機実験を通して、ゆらぐ環境に適応してきた生物情報処理システムの特徴を明らかにし、生体システムが有する「低エネルギー性」、「柔軟性」、「自発性」、「自律性」、「ロバストネス」を実現した新しい人工機械の創成に関わる技術開発指針の確立に寄与したい。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、有意義な議論をしていただいた大阪大学柳田敏雄研究室の方々に感謝いたします。また、1分子イメージングという新たな手法

を開発し、1分子生理学という未知の分野を開拓された諸先輩方への敬意をここに表します。ここに紹介した筆者らの研究の一部は、MEXTリーディングプロジェクト・バイオナノプロセス及び科学技術振興調整費・先端融合領域イノベーション創出拠点の形成「ゆらぎプロジェクト」によってサポートされている<sup>13)</sup>。

## 参考文献

1. T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito and T. Yanagida : Nature 374, 555 (1995) .
2. Y. Ishii, A. Ishijima and T. Yanagida : Trends Biotechnol. 19, 211(2001) .
3. A. Ishijima and T. Yanagida : Trends Biochem. Sci. 26, 438(2001) .
4. Y. Sako, S. Minoghchi and T. Yanagida : Nat. Cell Biol. 2, 168(2000) .
5. Y. Sako, K. Hibino, T. Miyauchi, Y. Miyamoto, M. Ueda and T. Yanagida : Single Mol. 1, 159(2000) .
6. M. Ueda, Y. Sako, T. Tanaka, P. Devreotes and T. Yanagida: Science 294, 864(2001) .
7. Y. Sako and T. Yanagida : Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Suppl, SS1(2003) .
8. T. Wazawa and M. Ueda: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Microscopy Techniques. (Jens Rietdorf, ed) . SpringerVerlag, Special Volume 95, 78(2005) .
9. M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, A. H. Iwane and T. Yanagida : Biochem. Biophys. Res. Commun. 235, 47(1997) .
10. S. Matsuoka, M. Iijima, T. M. Watanabe, H. Kuwayama, T. Yanagida, P. Devreotes and M. Ueda: J. Cell Sci. 119, 1071(2006) .
11. F. Vazquez, S. Matsuoka, W. R. Sellers, T. Yanagida, M. Ueda and P. Devreotes: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 3633(2006) .
12. Y. Miyanaga, S. Matsuoka, T. Yanagida and M. Ueda : Biosystems, in press.
13. 『ゆらぎプロジェクト』のホームページ : <http://www.yuragi.osaka-u.ac.jp/>