OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	エバネッセント場照明による1分子偏光測定
Author(s)	齋藤, 究
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3129357
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

エバネッセント場照明による1分子偏光測定

Polarization measurement of single fluorophores with evanescent field

科学技術振興事業団　柳田生体運動子プロジェクト

齋藤 究

1997年4月

概要

蛍光色素1分子の偏光からタンパク質分子の構造変化を検出することを目的として、**新しい蛍光観察法の開発**と**蛍光色素1分子の偏光測定**をおこなった。そして、以下のような結果を得た。

- 対物レンズ型エバネッセント場照明を用いて蛍光色素1分子を水溶液中で実時間観察する顕微鏡を開発した。

- 二重染色されたミオシン分子とアクチンフィラメントを簡単な光学系で画像化できるように、アンチストークス蛍光を観察する照明方法を開発した。

- 蛍光色素1分子の偏光度を測定するときの問題点について理論的な解析をおこなった。その結果、蛍光色素1分子の偏光度を顕微鏡で測定するときには蛍光色素の励起ダイポールの偏光度を測定する方法が有効であるという結論を得た。

- 蛍光色素1分子の励起偏光度を測定できる顕微鏡を開発し、テトラメチルローダミン1分子の励起ダイポールの偏光度を計測した。

- ミオシンに結合した蛍光色素テトラメチルローダミンの偏光度を測定したところ、100 ms 程度の遅い構造変化を検出することができた。蛍光色素はサブ秒から数秒のオーダーで揺らいでいた。

- ミオシンの SH1 に結合したテトラメチルローダミンと軽鎖に結合したテトラメチルローダミンの励起ダイポールの偏光度を測定し、前者のほうがブラウン運動の程度が小さいという結果を得た。また、アクチンフィラメントの結合は軽鎖部分のゆらぎに影響を与えていた。

本研究で使用した対物レンズ型エバネッセント場照明法はプリズム型エバネッセント場照明法と同様に蛍光色素1分子を可視化でき、プリズム型と比べて光学系が簡単で操作も容易である。蛍光 ATP アナログ、Cy3-ATP、を使うことにより ATP 加水分解反応を1分子レベルで可視化することも可能である。また、AFM をはじめとする様々な実験装置と組み合わせることも可能である。アンチストークス蛍光を観察する方法では、二重染色サンプルを観察する場合でも励起レーザが1波長で十分なので照明の光学系をシンプルにできる。そして、これらの新しく開発した蛍光観察法により、蛍光色素1分子の偏光度を測定することができるようになった。この1分子蛍光偏光測定法を使うと、タンパク質に結合した蛍光プローブの回転からタンパク質の構造変化を計測することができる。

目次

概要 2

1 序論 5
1.1 タンパク質構造変化検出 5
1.2 筋肉研究と顕微鏡観察 6
1.3 1分子蛍光観察 7
1.3.1 1分子観察の目的 *7*
1.3.2 1分子観察を実現すべき環境 *8*
1.3.3 1分子観察に必要な技術的条件 *8*
1.4 エバネッセント場照明 9
1.5 この論文の内容 13
1.5.1 新しい蛍光顕微鏡観察法の開発 *13*
1.5.2 1分子偏光測定 *13*

2 新しい蛍光観察 14
2.1 対物レンズ型エバネッセント場照明 14
2.2 アンチストークス蛍光の観察 17
2.2.1 BODIPY FL の選択 *18*
2.2.2 アンチストークス蛍光 *19*
2.3 使用したサンプル 19
2.4 対物レンズ型エバネッセント場照明顕微鏡 22
2.5 蛍光観察結果 27
2.5.1 蛍光色素1分子のイメージング *27*
2.5.2 BODIPY FL 標識アクチンフィラメントとTRIA 標識 S1 の観察 *33*
2.5.3 Cy3-ATP によるアクチンフィラメントの滑り運動 *37*
2.6 考察 41
2.6.1 アンチストークス蛍光の観察 *41*
2.6.2 対物レンズ型エバネッセント場照明 *42*
2.6.3 蛍光色素 1 分子とアクチンフィラメントの同時可視化 *44*

3 蛍光色素1分子偏光測定 46
3.1 偏光度測定の理論的計算 46
3.1.1 対物レンズによる屈折 *46*
3.1.2 対物レンズを通して観察される蛍光強度 *48*
3.1.3 放出の偏光度 *50*
3.1.4 吸収の偏光度 *50*
3.1.5 結論:何をどう測定すればよいのか *53*
3.2 偏光測定装置とサンプル 53
3.2.1 タンパク *53*
3.2.2 標準サンプル *54*
3.2.3 顕微鏡 *54*
3.2.4 1分子偏光度測定手順 *56*
3.3 実験結果 59
3.3.1 励起偏光度の測定 *59*
3.4 考察 64

3.4.1 計測できる偏光度の範囲 *64*
3.4.2 タンパク質のゆっくりした構造のゆらぎ *64*
3.4.3 色素のゆらぎモデル *64*
3.4.4 TRIA の移動度 *65*
3.4.5 アクチンフィラメントの影響 *67*
3.4.6 発展 *67*

4 結論 69

謝辞 71

文献 72

参考文献 76

図版目録 77

表目次 78

1 序論

化学エネルギーを力学エネルギーに変換するモータータンパク質、ミオシンやキネシンはその力発生の過程において構造が変化している。モータータンパク質分子に限らずその他様々なタンパク質分子がその酵素反応の過程で程度の差こそあれ構造変化を伴っているということは、疑いの余地がないものであろう。このようなタンパク質分子の動作原理の解明には、その構造変化をとらえることが解決への一つの手段である。

1.1 タンパク質構造変化検出

タンパク質の構造変化を検出する方法には種々の方法が存在する。大きく二つに分けて直接タンパク質の構造を解く方法としての X 線結晶構造解析と、タンパク質にプローブとなる分子を結合させてそれからのシグナルを検出する EPR 法や蛍光プローブ法などがある。

いろいろなタンパク質の結晶構造が X 線結晶構造解析により解かれている。この方法では解像度数Å程度という高分解能で結晶構造を解くことができる。その反面、得られる構造は多分子の平均化された構造である。タンパク質酵素反応過程中の様々な中間状態で結晶を作成することにより反応過程中の構造変化をとらえることもできる。一般にこの手法を用いるときにはヌクレオチドアナログなどを用いて酵素反応を途中で止める。ヌクレオチドアナログを使用することはタンパク質の真の構造を反映していない可能性がある。

X 線結晶構造解析は分解能が高くタンパク質の動作原理を推測する情報を与えてくれるものである。しかし、タンパク質の真の性質はダイナミックな動きの中に隠されているものであり、ある瞬間に固定されてしまった結晶からはダイナミックな情報を引き出すことはできない。蛍光プローブを使用する方法はタンパク質分子を生きたまま標識することが可能で、蛍光プローブのシグナルからタンパク質分子のダイナミックな構造変化を調べることができる。

蛍光プローブはその扱い安さと得られる情報量の多さ、測定の簡便さからいろいろな蛍光プローブで種々の測定がおこなわれている(木下 & 御橋, 1983)。蛍光プローブを使用した構造変化の検出方法には、蛍光色素の向きを検出する方法や異なる二つの蛍光色素の距離を測定する方法がある。前者は蛍光プローブの励起ダイポールまたは光放出ダイポールの向きを検出する方法であり、後者は二つの異なる性質を持った蛍光プローブ間のエネルギー移動効率を測定する方法である。また、環境依存性の蛍光プローブを使用することによりタンパク質の構造変化をとらえる方法もある。

1995 年、蛍光色素1分子の水溶液中実時間可視化が可能になったので(Funatsu *et al.*, 1995)、蛍光プローブを用いた種々の測定方法をタンパク質1分子レベルの研究に応用できるようになった。蛍光色素1分子のイメージングと組み合わせた水溶液中の1分子分光が可能

になり(和沢、 1997)、この分光法を使用してトロポニンCとトロポニンIに結合したテトラメチルローダミンとCy5間の蛍光エネルギー移動により構造変化が調べられた。

構造変化を検出する方法の中で、タンパク質の活性を保ったまま1分子レベルの測定ができる方法は蛍光プローブを用いた方法しかない。蛍光色素1分子から放出される蛍光は微弱である。蛍光をスペクトル方向に展開した時には十分なシグナルを得るために数秒間の積分をおこなう必要がある。時間分解能の高い測定には蛍光色素1分子の偏光状態を測定する方法が有効である。蛍光色素1分子偏光測定によりタンパク質分子の構造変化を数 ms の時間分解能で測定することが可能である。

1.2 筋肉研究と顕微鏡観察

蛍光顕微鏡観察法は筋肉中に含まれる分子モーター、ミオシン、によるエネルギー変換過程の研究に欠かせない手段となっている。1985年、Yanagidaらは蛍光標識した筋原線維の収縮速度からATP 1分子によって引き起こされるアクチンフィラメントの滑走距離を計算し、ミオシンヘッドによる滑り運動の発生は従来の首振り説では説明できないことを示した。さらに、蛍光顕微鏡による1本のアクチンフィラメントの可視化によって(Yanagida *et al.*, 1984)、アクトミオシンモーターの性質を分子レベルで解明する新しい *in vitro* 運動再構成系が開発された(Kron & Spudich, 1986; Harada *et al.*, 1987)。また、蛍光顕微鏡とレーザトラップを組み合わせた1本のアクチンフィラメント操作法により生体内に近いタンパク質構造を保ったまま滑り運動を再現する実験系も確立された(Saito *et al*, 1994)。蛍光顕微鏡下、微小ガラス針やレーザトラップによって1本の蛍光標識したアクチンフィラメントを超微操作する技術とナノメトリーを組み合わせることにより、ミオシン分子による個々の分子力学反応を直接測定することができるようになった(Ishijima, *et al.*, 1991; Ishijima, *et al.*, 1994; Finer, *et al.*, 1994; Molloy, *et al.*, 1995)。

ミオシン分子モーターに限らず、DNA の翻訳や、酵素反応といった広範囲にわたる生体分子プロセスの研究が蛍光顕微鏡を用いることにより急速に進んできた。1981 年、蛍光顕微鏡を使用して水溶液中で1本の蛍光標識したDNAが可視化された(Yanagida *et al.*, 1984)。またDNAの弾性的な性質も直接調べられ(Yanagida *et al.*, 1983; Houseal *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1992; Perkins *et al.*, 1994; Bensimon *et al.*, 1995)、RNAポリメラーゼとDNAの間の相互作用も研究されている(Schafer *et al.*, 1991; Kabata *et al.*, 1993; Yin *et al.*, 1994, 1995)。

さらなる技術進歩によって、蛍光顕微鏡により蛍光色素1分子を可視化することができるようになった。蛍光色素1分子は通常の高感度ビデオカメラで可視化するに十分な光子を放出することが報告されていた(Harada & Yanagida, 1988)。しかしながら、蛍光色素1分子可視化の主要な問題点は光散乱と光放出による莫大な量の背景光であった。近年、Betzig らはイルミネーションモードのスキャニングプローブ顕微鏡で空気と物体との界面にある蛍光色素を照明することにより背景光を減らすことに成功し蛍光色素1分子を検出した(Betzig & Chichester, 1993; Trautman *et al.*, 1994)。しかし、この方法は水溶液中での蛍光色素1分子可視化には

応用できない。生体分子は水溶液中でのみ機能を発することができるので、水溶液中で可視化することが大切である。コンフォーカル顕微鏡によって水溶液中の蛍光色素1分子を検出することも可能になった(Nie *et al.*, 1994)。しかし、スキャニングプローブ顕微鏡やコンフォーカル顕微鏡を使用しては単一蛋白質分子や ATP 加水分解反応を実時間で可視化する事は難しい。というのも、これらの方法は長い時間をかけて一定の範囲を走査しなければならないからである。背景光を減らすためにレーザを励起光に使用し、さらに光学素子からの背景光も減少させた落射蛍光顕微鏡によって蛍光色素1分子を水溶液中で観察することが可能になった(Funatsu *et al.*, 1995; Sase *et al.*, 1995)。Saseらはこの観察方法を使い、アクチンフィラメントがガラス表面に吸着したミオシン分子上を滑走するときにアクチンフィラメントが回転していることを、アクチンフィラメントに結合したテトラメチルローダミン1分子の蛍光放出の偏光状態から示した(1995)。また、背景光を減らすために励起領域を極端に狭めたエバネッセント場照明によって蛍光色素1分子の水溶液中実時間観察も可能になった(Funatsu *et al.*, 1995)。この低背景光エバネッセント場照明顕微鏡法はモータータンパク質1分子の運動の可視化と(Vale *et al.*, 1996)、モータータンパク質ミオシン1分子による個々の化学反応の可視化を可能にした(Funatsu *et al.*, 1995; Tokunaga *et al.*, to be submitted)。

1.3 1分子蛍光観察

1.3.1 1分子観察の目的

分子に個性はあるか

タンパク質分子に限らず1分子を解析すれば、平均化されていない物理量を計測できる。通常は、検出器の感度が低いので多数の分子の平均の性質を計測している系でも、分子はおのおの異なる様相で反応をおこなっている。たとえば、1.0 mg/ml = 2.1 μMミオシン、1 ml の ATP 加水分解反応を測定して 30 s^{-1} という値が観測されたとする。この値は 1.3×10^{15} 分子の平均の ATP 加水分解反応である。すべての分子が同期をとって ATP を加水分解しているわけではない。また、一つの分子をみても一定の時間間隔で ATP を加水分解しているわけではない。ところが、1分子の ATP 加水分解反応を測定することにより、1分子の性質を明らかにすることができる。はたして、ミオシン分子はお互いにどのくらい個性があるのだろうか。また、1分子の ATP 加水分解反応の速度はどのぐらい揺らいでいるのだろうか。1分子計測はタンパク質分子のゆらぎの性質を観察可能する。

時間分解能の向上

平均からの解放は時間分解能の向上をもたらす。時間分解能は十分にあるのだが、測定の感度が足りないために数多くの分子の平均像しか観察できなかったとしよう。すべての分子が同じ反応を同時に繰り返していたら反応の微細構造も測定できる。しかし、個々の反応が微妙に異なっていたら反応の微細構造は平均化され見えてこない。1分子反応測定は平均する必要がないので反応の微細構造を直接計測できる。

誰でもわかるデータ解析

平均からの解放を言い換えるとそれは統計処理からの解放でもある。多分子系で得られた実験データからタンパク質1分子の特性について言及するときには、得られたデータに何らかの統計的な処理を加えることによって初めて1分子に対する特性を言及できる。しかし、そこに存在する分子が1分子であることを証明しておけば、ときに曖昧でときに議論の余地を残したままの処理を経ずして、1分子の特性を指し示すことができる。

微少量アッセイ

1分子アッセイでは必要なサンプル量、サンプル濃度が極端に少ない。実際に蛍光標識タンパク質を顕微鏡で観察するときには 100 pM から数 10 pM の濃度の蛍光標識サンプルをカバーガラス上に載せる。これは先に例示した ATP 加水分解反応測定におけるミオシン濃度の 1,000 分の 1 から 100,000 分の 1 の濃度である。プレパレーションが非常に難しく、極微量しか精製できないようなタンパク質でも解析できる。

1.3.2 1分子観察を実現すべき環境

タンパク質分子は水溶液中でしか機能しないので、タンパク質分子を標識した蛍光色素1分子の観察も水溶液中でおこなわなければならない。

蛍光色素の観察は蛍光顕微鏡とTVカメラを組み合わせることにより、実時間で2次元イメージングすることが必要である。1分子の物理計測手段はタンパク質分子のどんな性質を測定するかによって異なる。しかし、得られた計測データが確かにタンパク質1分子によるものであることを確認するために、そこに存在する分子が1分子であるということをイメージングせねばならない。また、カメラ以外の検出器で1分子の蛍光を検出したり、他のセンサーでタンパク質分子の物理的性質を測定するためには、検出器の測定スポットにタンパク質分子を移動させるといった顕微鏡の操作が必要である。そのためにも、数秒から数 10 秒は蛍光色素が退色せずに蛍光を放出している必要がある。

1.3.3 1分子観察に必要な技術的条件

背景光の除去

蛍光色素1分子は市販の高感度カメラが検出するに十分な量の光子を放出している(Harada & Yanagida, 1988)。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 TV カメラで実時間観察する事ができなかった。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っていたからである。背景光の原因としては、励起光の漏れや光学系に含まれるガラスが出す蛍光、イマージョンオイルの蛍光、水のラマン散乱などが挙げられる。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。

レーザを照明光として用いることは励起光の除去という意味で非常に有効である。なぜならレーザの波長スペクトル幅は通常数 nm 以下なのでダイクロイックミラーやホログラフィックノッチフィルターで除去することが容易だからである。

背景光を発生させないためには、観察したい蛍光色素が存在する領域のみを照明すればよい。そのためには、水とガラスの境界面で起こる光の全反射を利用したエバネッセント場照明(後述)が有効である。エバネッセント場は全反射の境界面から水側に 100 nm 程度しか発生しないのでガラス表面近傍に存在する蛍光色素のみを照明でき、背景光の発生を最小限に抑えることができる。

みえるものをみる

1分子観察に使用する蛍光色素は退色が遅いものでなければならない。さらに、吸光度が大きくて量子効率が高い色素を使う必要がある。そのような色素として、シアニン系色素の Cy3 や Cy5 とテトラメチルローダミンが挙げられる。

検出感度

蛍光色素1分子からの蛍光は微弱であるから、高感度の検出器を使う必要がある。ローダミンファロイジンで標識したアクチンフィラメントは SIT カメラで観察されてきたが、本研究ではより感度を上げるためにイメージインテンシファイアーと SIT カメラを組み合わせて使用した。

1.4 エバネッセント場照明

エバネッセント場照明とは

エバネッセント場とは、屈折率の異なる物質の境界面に発生する電磁場である。高屈折率の媒質(例えばガラス)から低屈折率の媒質(例えば水)に光が進入すると、屈折率の違いから光は屈折により進行方向を変える。入射角がある一定の角、臨界角、よりも大きくなると、光は低屈折率媒質中に進入できなくなり、媒質の境界面で全反射する。このとき、低屈折率側媒質に進行はしないが、境界面付近に定在する電磁場が発生する。この電磁場をエバネッセント場と呼ぶ。エバネッセント場の発生は、入射した光の波長と両方の媒質の屈折率に依存する。この電場の特徴として、電場強度が入射した光の強度に比例すること、低屈折率媒質側へ伝幡しないこと、電場の強度は境界面からの距離に依存して急激に減衰することなどが挙げられる。このエバネッセント場によって蛍光色素を励起する方法がエバネッセント場照明法である。

エバネッセント場照明の目的

エバネッセント場照明を蛍光照明に使用する目的は、背景光を減少させるためである。

エバネッセント場照明によって改善される背景光として次のようなものが挙げられる。(1)水のラマン散乱。エバネッセント場照明では励起する範囲が媒質の境界面からおよそ100 nm程度である。落射照明に比べて照射している水の体積が格段に小さいのでラマン散乱の発生を減少させることができる。(2)厚みを持ったサンプルにおける非観察部分からの蛍光。落射照明による細胞の観察では、たとえ細胞の表面のみを観察しようとしても細胞質まで照明されてしまう。その結果細胞質に存在する物質の自家蛍光により背景光が上昇してしまう。エバネッセント場照明を使えば、細胞表面のみを励起することができるので、背景光の発生を抑えることができる。また、蛍光性ATPアナログCy3-ATPを用いた化学反応の可視化においても溶液中に漂っているCy3の励起を少なくすることができる。(3)対物レンズやイマージョンオイルからの蛍光。プリズムを使ったエバネッセント場照明では(Funatsu *et al.*, 1995)、落射蛍光照明と異なり対物レンズ内を励起光が通過しないので対物レンズやイマージョンオイルからの蛍光がバックグラウンドとして観察されない。

エバネッセント場の強度計算

エバネッセント場強度Iの境界面からの距離z依存性は次の式であらわされる。

$$I(z) = \exp\left(-2k_0 z\sqrt{\sin^2\theta_i - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}\right)$$

ここで、k_0は入射光の波数でzは境界面からの距離、θ_iは光の入射角、n_1とn_2は両方の媒質の屈折率で$n_1>n_2$である。入射角が大きいほど、また、波長が短いほどエバネッセント光のしみこみ深さは浅くなる。BK7ガラスと水の境界面に波長532 nmの光が入射したときの電場強度の深さ依存性を図2に示す。この条件での臨界角は61°である。電場強度が$1/e$になる境界面からの距離zは入射角62°で358 nm、85°で89 nmである。入射角が大きいほどエバネッセント場のしみこみ深さは短い。

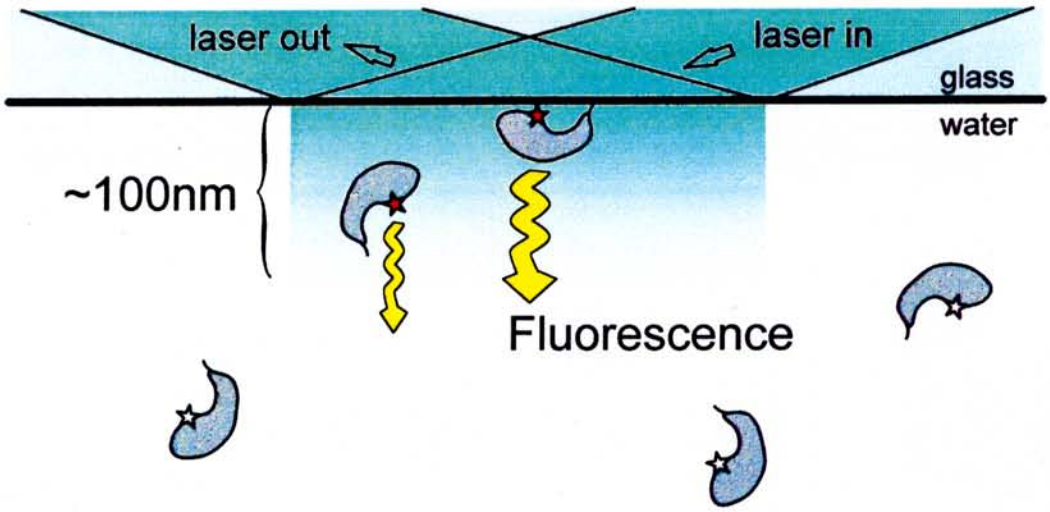


図1　エバネッセント場照明の模式図
高屈折率媒質（例えばガラス）中から低屈折媒質（例えば水）方向に入射したレーザは入射角が臨界角よりも大きいと全反射によって低屈折率媒質に進入しない。光の全反射によって低屈折率媒質側にエバネッセント場が発生する。エバネッセント場中に存在する蛍光色素はその電場により励起され蛍光を放出する。エバネッセント場の電場強度は境界面からの距離に依存して指数関数的に減少する（図 2）。

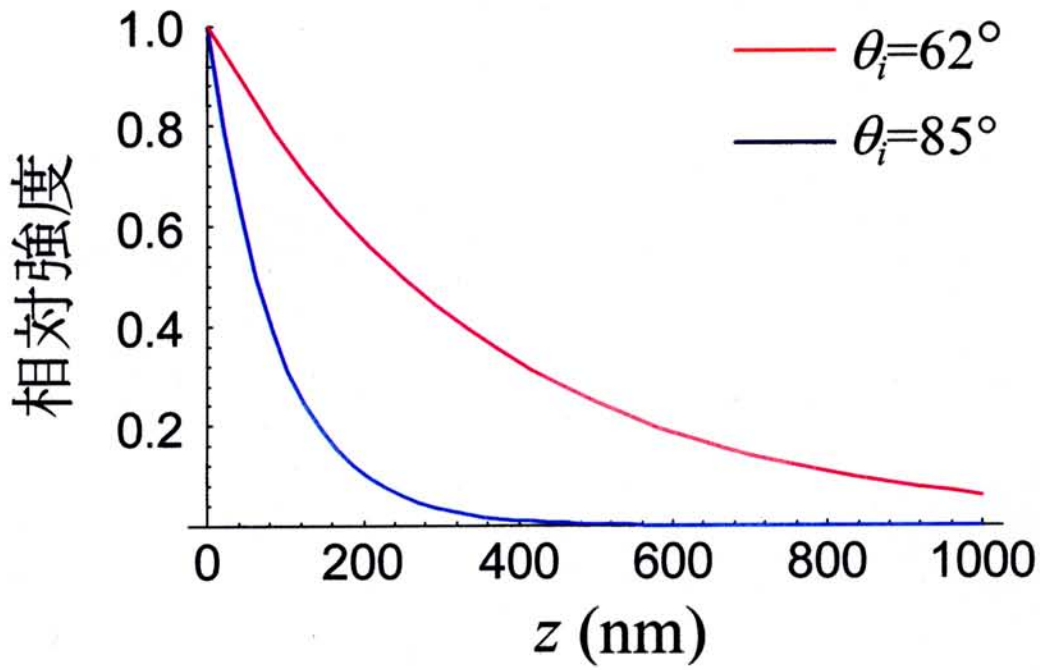


図2 エバネッセント場強度の深さ依存性
低屈折率媒質中におけるエバネッセント場の電場強度と全反射面からの距離(z)の関係を示す。水とガラスの境界面における電場強度で規格化。高屈折率側は BK7 ガラスで、屈折率 1.52、低屈折率側は水で屈折率 1.33。光の波長、532 nm。この条件での臨界角は 61°。入射角が 62°と 85°での関係を示した。

1.5 この論文の内容

タンパク質の構造変化を1分子レベルで測定することを目的として、そのための顕微鏡開発をおこなった。この装置を使ってミオシン S1 の構造変化を1分子レベルで検出することを試みた。

1.5.1 新しい蛍光顕微鏡観察法の開発

対物レンズ型エバネッセント場照明を改良する事により蛍光色素1分子を観察可能な顕微鏡を構築した。この方法は、従来から使用されてきたプリズム型エバネッセント場照明と同様に1分子観察には支障のない十分な性能を示した。さらに、プリズム型エバネッセント場照明と比較して観察が容易であるという利点を持つ。

また、二重標識したサンプルを簡単な光学系で観察するために蛍光色素のアンチストークス蛍光を観察する光学系を構築した。この光学系を用いてBODIPY FL標識アクチンフィラメント1本とテトラメチルローダミン標識ミオシン S1 1分子またはBODIPY FL 標識アクチンフィラメント1本と Cy3 標識 ATP アナログ1分子の同時可視化をおこなった。

1.5.2 1分子偏光測定

蛍光色素1分子観察顕微鏡を用いて蛍光色素の偏光度からその向きを検出する場合の理論的な解析をおこなった。その結果蛍光色素の励起ダイポールの偏光度を測定する方法が有効であるという結論を得た。この結果に基づき、蛍光色素1分子の励起偏光度を計測できる顕微鏡を構築した。そして、ミオシン S1 に結合したテトラメチルローダミンの励起ダイポール偏光度を1分子レベルで測定することができた。

さらに、S1 に対する結合位置によってテトラメチルローダミン分子のゆらぎに違いが出るかどうか調べた。その結果、SH1 に結合したときはテトラメチルローダミンのゆらぎは小さいが軽鎖部分に結合したときはゆらぎが大きいという結果が得られた。さらに、アクチンフィラメントとの結合によって軽鎖部分のゆらぎは変化を受けるという結果が得られた。

2 新しい蛍光観察

タンパク質の構造変化を蛍光色素1分子の偏光から検出するために、対物レンズ型エバネッセント場照明法とアンチストークス蛍光観察法という新しい蛍光観察法が必要となったので、それを可能にする顕微鏡を作成した。この顕微鏡により、対物レンズ型エバネッセント場照明による蛍光色素1分子の観察を行い、テトラメチルローダミン1分子とCy3 1分子の水中実時間観察をおこなった。この観察像は今まで使われてきたプリズム型エバネッセント場照明と比較しても遜色のない画質であった。また、アクチンフィラメントを標識したBODIPY FLのアンチストークス蛍光を観察することに成功した。さらに、テトラメチルローダミンで標識したS1とそのS1が結合したBODIPY FL標識アクチンフィラメントの同時可視化をおこなった。アンチストークス蛍光を用いた蛍光色素1分子同時観察の例として、Cy3-ATP を用いたアクトミオシン滑り運動再構成系の実験をおこない、Cy3-ATP 1分子の化学反応とそれに共役するアクチンフィラメントの滑り運動の同時可視化をおこなった。

2.1 対物レンズ型エバネッセント場照明

今まで、蛍光色素1分子の水中実時間観察は落射蛍光照明か(Funatsu *et al.*, 1995; Sase *et al.*, 1995)、プリズム型エバネッセント場照明(Funatsu *et al.*, 1995)によりおこなわれてきた。蛍光色素1分子の可視化だけならこの方法で十分であるが、蛍光色素分子の励起の偏光度からタンパク質の構造変化を検出する目的には、これらの方法では不十分である。この節では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を比較した後、後者の方法が必要になった理由について説明する。

プリズム型エバネッセント場照明

プリズム型エバネッセント場照明では、ガラスと水の境界面でレーザを全反射させるためにプリズムブロックを必要とする(図 3)。屈折率の大きい媒質から屈折率の小さい媒質方向に臨界角よりも大きな入射角で光が入射すると、その光は全反射する。空気の屈折率は水の屈折率よりも小さいのでカバーガラス上方からレーザを入射したのではガラスと水の境界面で全反射は起こらない。全反射させるためには、スライドガラスにイマージョンオイルを介してプリズムブロックを接触させ、臨界角以上の大きさで水とガラスの境界面に光が入射するようにする。

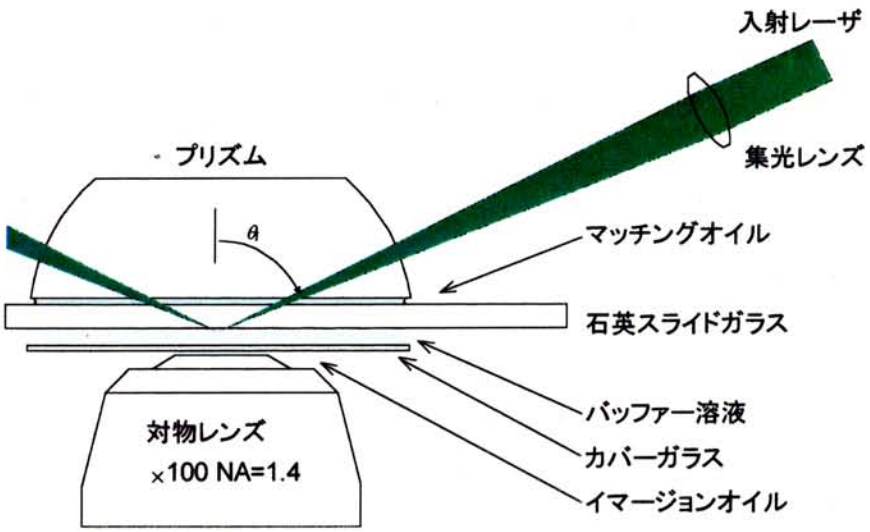


図3　プリズム型エバネッセント場照明
プリズムとスライドガラスの間は、ガラスと同じ屈折率を持つマッチングオイルで満たされている。入射レーザはレンズによりスライドガラスとバッファー溶液の境界面にある観察領域に焦点を結ぶ。集光用レンズの焦点距離が長いので(50 mm 程度)焦点のスポットサイズを小さくできない。対物レンズより遠い面のガラス表面を観察するので、バッファー溶液の厚さを対物レンズの作動距離よりも厚くできない。

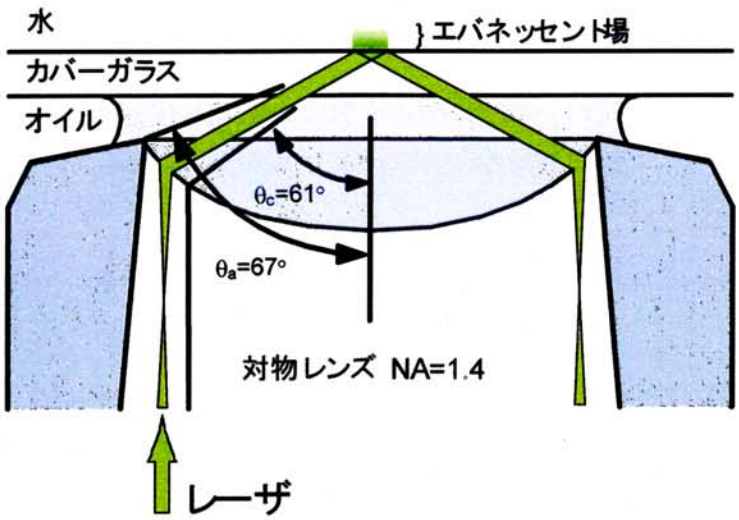


図4　対物レンズ型エバネッセント場照明
対物レンズの開口数は $NA = 1.4$。レーザは対物レンズの後焦点面に焦点を結ぶようにレンズで集光されて入射する。θc はガラスと水の界面での全反射の臨界角。θa はガラスの屈折率 $n = 1.52$ を用いた関係式、$NA = n \sin \theta a$ で定義される最大の入射角。エバネッセント光の染み出し深さは約 350 nm。

この、プリズムブロックを使ったエバネッセント場照明法ではサンプルを交換するたびにプリズムの取り外しと再セットをおこなう必要がある。プリズムを取り外すと、レーザとプリズムの位置関係が変化する可能性がある。結果として、レーザの全反射位置にずれが発生し、それによる照明強度の変化が起こる。このことは、再現性を求める実験の妨げになる。特にレーザを照明光に用いたときには、レーザの高い干渉性により照明光にムラができる場合がある。この問題は、次の章でおこなった1分子の励起偏光測定では特に問題となる。照明強度の変化は励起効率の変化をもたらし、偏光度計算の誤差を大きくするからである。

必要な照明の条件

この問題を解決するためには、照明用光学系を操作することなくサンプル交換が可能な照明方法を使う必要がある。対物レンズ型エバネッセント場照明はこの要求を満たす照明方法である。

対物レンズ型エバネッセント場照明

対物レンズ型エバネッセント場照明は、開口数の大きい対物レンズを使用する事により、プリズムを用いることなく水とカバーガラスの境界面にエバネッセント場を発生させる方法である。つまり、対物レンズをプリズムの代わりとして使用するものである。無限遠補正系対物レンズを使用したときの対物レンズ型エバネッセント場照明の概略を図 4に示す。照明光となるレーザは対物レンズの後焦点面に焦点を結ぶように入射する。レーザの光軸と対物レンズの光軸中心が一致しているときは落射蛍光照明となる。レーザの光軸を対物レンズ光軸中心から平行移動により遠ざけていく。無限遠補正系の対物レンズでは光軸中心に対し平行に入射した光は必ず観察面中心を照射するので、レーザが平行移動しても照明範囲は移動しない。しかし、カバーガラスと水の境界面に対する入射角は徐々に大きくなっていく。レーザと光軸中心がある一定の距離を超えると、レーザの入射角は臨界角よりも大きくなりレーザは全反射をおこす。その結果としてエバネッセント場が発生する。

水の屈折率を 1.33、ガラスの屈折率を$n = 1.52$とすると臨界角は 61°となる。対物レンズの開口数NAと最大の入射角θaの関係は$NA = n \sin \theta a$と表される。$\theta a > \theta c$を満たす対物レンズは開口数 1.4 のものしかない。

対物レンズ型エバネッセント場照明では照明用の励起光が対物レンズ胴付け面側から入射し、発生した蛍光も胴付け面側に抜けていく。プリズム型エバネッセント場照明と違って、サンプルを交換する時に照明光学系を操作する必要がない。このことは、実験ごとに同一の条件で照明が可能であることを意味する。以上のような理由から次章で述べる1分子偏光測定では対物レンズ型エバネッセント場照明を使用することにした。

2.2 アンチストークス蛍光の観察

ミオシン分子とアクチンフィラメントの相互作用の様子を1分子偏光顕微鏡で計測する際には、両方のタンパク質を可視化しなければならない。テトラメチルローダミンで標識したミオシンは532 nmで励起し、580 nm近辺の蛍光を観察する。アクチンフィラメントはテトラメチルローダミンと異なる蛍光色素で標識しなければならない。

2.2.1 BODIPY FLの選択

アクチンフィラメントを標識する蛍光色素は以下のような観点からBODIPY FL(λ_{ex} = 503 nm, λ_{em} = 512 nm)を選択した。

(1) テトラメチルローダミンと蛍光波長が異なること。BODIPY FLはそのピーク蛍光波長が512 nmであり、テトラメチルローダミンのピーク蛍光波長、567 nmよりも短波長側に蛍光を発する。ダイクロイックミラーやバンドパスフィルターによって分離可能である。そのほかに、テトラメチルローダミンよりも長波長側に蛍光を出す色素としてCy5などが挙げられる。Cy5の蛍光もテトラメチルローダミンの蛍光と分離可能である。

(2) レーザによる励起が可能であること。対物レンズエバネッセント場照明を使用するために、水銀落射照明用の投光管を取り去った。その結果水銀落射照明を使用できなくなった。よってアクチンフィラメントもレーザで励起しなければならない。

(3) アクチンフィラメントを標識した蛍光色素励起用のレーザを導入しても照明用のダイクロイックミラーを操作する必要がないこと。ダイクロイックミラーの移動は照明光軸のずれを引き起こす原因となる。前節でも述べたが、照明光強度の変化は励起効率のゆらぎとなり、励起の偏光度測定の誤差となる。また、蛍光色素1分子は退色がはやい。煩雑な操作が必要では、蛍光色素が退色してしまい測定できない。顕微鏡の操作は少ない方がよい。

(2)と(3)の理由から、励起用のレーザを2波長導入し、なおかつ異なる二つの蛍光色素の蛍光を透過するダイクロイックミラーの設計は非常に困難なものである。アクチンフィラメントをCy5で標識し、HeNeレーザの633 nmで励起すると仮定する。そのとき、ダイクロイックミラーで反射される波長領域はおよそ532±20 nmと633±20 nmとなるが、後者の波長領域はテトラメチルローダミンの蛍光領域に被さっている。蛍光色素1分子の観察ではできるだけ多くの蛍光を検出系に導かなければならず、1分子からの蛍光波長領域を励起光カットのためにブロックすることは現実的ではない。又、もう一つの組合わせとして、アクチンフィラメントをBODIPY FLで標識し、Arレーザの488 nmで励起する組合わせがある。このときにダイクロイックミラーが反射しなければならない波長領域は488±20 nmと532±20 nmとなるが、これではBODIPY FLの蛍光はほとんど透過しない。

そこで、アクチンフィラメントをBODIPY FLで標識し、波長532 nmのNd:YAGレーザで励起することにした。両方の色素を532 nmのみで励起することによりダイクロイックミラーが透過波長

をブロックする領域が減少し、BODIPY FL の蛍光がダイクロイックミラーを透過する。レーザ光を取り除くホログラフィックノッチフィルターによる励起波長領域のブロックも最小限に抑えることができる。さらに、励起用のレーザが1波長しか必要ないので、光学系もシンプルに設計することができる。

2.2.2 アンチストークス蛍光

励起光よりも長波長側に放出される蛍光をストークス蛍光といい、逆に短波長側に放出される蛍光をアンチストークス蛍光という。BODIPY FL (λ_{ex} = 503 nm, λ_{em} = 512 nm) の観察においては波長 532 nm の Nd:YAG レーザで励起し、500~520 nm に放出される蛍光を観察している。波長 532 nm は BODPY FL の励起スペクトルのピーク波長、503 nm よりも長波長であるばかりか、蛍光スペクトルのピーク波長、512 nm よりも長い。この観察方法では 532 nm で励起したときのアンチストークス蛍光を観察している。

2.3 使用したサンプル

アクチンフィラメントとミオシン、ミオシン調節軽鎖の調整

アクチンはウサギ骨格筋のアセトンパウダーより抽出し、Spudich と Watt の方法 (1971) により精製した。ミオシンはウサギの背筋と鶏の胸筋よりより抽出し、Szent-Gyrögy (1951) の方法で精製した。ミオシンサブフラグメント1 (以下 S1) は 20 mg/ml の鶏ミオシンを 10 μg/ml のパパイン (Worthington, USA) で Mg^{2+}存在下、20 °C において 15 分間処理することにより得た (Margossian *et al.*, 1981)。システイン残基を一つしか持たない鶏砂嚢ミオシン調節軽鎖 (以下 cgmRLC) および cgmRLC と biotin-dependent transcarboxylase (以下 BDTC) の融合タンパク質 (以下 BDTC-cgmRLC) は合成した cDNA を用いて *E. Coli* で発現させ (Messer & Kendrick-Jones, 1988; Iwane *et al.*, 1997)、Trybus と Chatman の方法 (1993) で精製した。なお、精製ではハイドロキシアパタイトカラムによる精製を省略した。

テトラメチルローダミンによる S1 のラベル

まず、cgmRLC に唯一存在するシステイン残基をテトラメチルローダミンヨードアセトアミド (以下 TRIA, λ_{ex} = 540 nm, λ_{em} = 567 nm; Molecular Probes, USA) で標識した後、この cgmRLC を S1 の軽鎖と交換した (以下 TRIA-S1)。100 μM cgmRLC, 2 mM TRIA, 2 M グアニジン塩酸、10 mM HEPES, pH 7.0 の溶液中で 0 °C において2時間反応させた。未反応の色素分子は Sephadex G-25 (NAP-5; Pharmacia, Sweden) を使い、0.5 M NaCl, 50 mM PIPES, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 7.0 の溶液で取り除いた。その後、蛍光標識した cgmRLC と S1 に内因性の軽鎖の交換反応をおこなった (Rejasekharan *et al.*, 1991; Iwane *et al.*, 1997)。S1 の蛍光標識率は、TRIA の 555 nm と 280nm におけるモル吸光係数をそれぞれ 62,900 $M^{-1}cm^{-1}$ と 22,000 $M^{-1}cm^{-1}$、S1 の 280 nm における吸光係数と分子量を 0.83 $(mg/ml)^{-1}cm^{-1}$ と 130 kDa として計算すると 65%であった。

Cy3 による S1 のラベル

システイン残基を一つ持つ BDTC-cgmRLC を Cy3 マレイミド(以下 Cy3-PEM)で標識した後、S1 の軽鎖と交換して S1 を蛍光標識した(以下 Cy3-BDTC-S1)。100 nmole の Cy3-OSu と 90 nmole の *N*-[2-(1-piperazinyl)ethyl]maleimide(同仁化学)を 25 µl の DMSO に溶かし 40 °C において一晩反応させて Cy3-PEM を生成した。cgmRLC と反応させる直前に 5 mM のグリシンを加え、未反応の N-hydroxysuccinimide エステルをブロックした。cgm-RLC と Cy3-PEM はモル比 1:5 で 0.6 M NaCl, 2 M グアニジン塩酸、10 mM HEPES, pH 7.0 の溶液中、25 °C において2時間反応させた。cgmRLC に反応させた後の未反応色素の除去と S1 への導入はテトラメチルローダミンによる S1 のラベルと同じである。S1 の蛍光標識率は、Cy3 の 552 nm と 280nm におけるモル吸光係数をそれぞれ 150,000 $M^{-1}cm^{-1}$ と 12,000 $M^{-1}cm^{-1}$、S1 と BDTC-cgmRLC の 280 nm における吸光係数をそれぞれ 0.83 $(mg/ml)^{-1}cm^{-1}$ と 0.2 $(mg/ml)^{-1}cm^{-1}$、BDTC-cgmRLC と S1、BDTC-cgmRLC-S1 の分子量をそれぞれ 32 kDa、130 kDa、145 kDa として計算するとほぼ 100%であった。

ミオシンの長いフィラメント

in vitro 運動再構成で使用する長いミオシンフィラメントは Nagashima の方法(1986)により調製した。フィラメント長はネガティブ染色後に透過型電子顕微鏡で確認したところ 10 µm 程度であった。

アクチンフィラメントの染色

アクチンはあらかじめ 1.0 mg/ml アクチン、100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 20 mM HEPES, pH 7.8 の条件でフィラメント化しておく。次に、0.1 mg/ml(モノマーで 2.5 µM) アクチン、7.5 µM BODIPY FL ファラシジン(Molecular Probes, USA)、25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 20 mM HEPES, pH 7.8 の溶液中、4°C において一晩反応させた。

蛍光標識した ATP アナログ

ATP のリボースを蛍光色素 Cy3 でラベルした蛍光性 ATP アナログ、3'(2')-*O*-[*N*-[2-[(Cy3)amino]ethyl]carbamoyl]-ATP(以下 Cy3-ATP、図 5)は 29 mM 3'(2')-*O*-[*N*-[2-(amino)ethyl]carbamoyl]-ATP(Cremo *et al.*, 1990; Sowerby *et al.*, 1993)と 100 nmole の Cy3.29 の *N*-hydroxysuccinimide エステル(Cy3-OSu; Biological Detection Systems, USA)を 400 ml の 0.5 M トリエタノールアミン、pH 8.5 中、25°C で3時間反応させて合成した(Tokunaga *et al.*, to be submitted)。pH を中性化した後、未反応の aminoethylcarbamoyl-ATP と Cy3 は逆相カラム(Resource RPC; Pharmacis, Sweden)で取り除いた。さらに Cy3-ATP の画分を陰イオン交換カラム(Mono Q; Pharmacis, Sweden)で精製した。

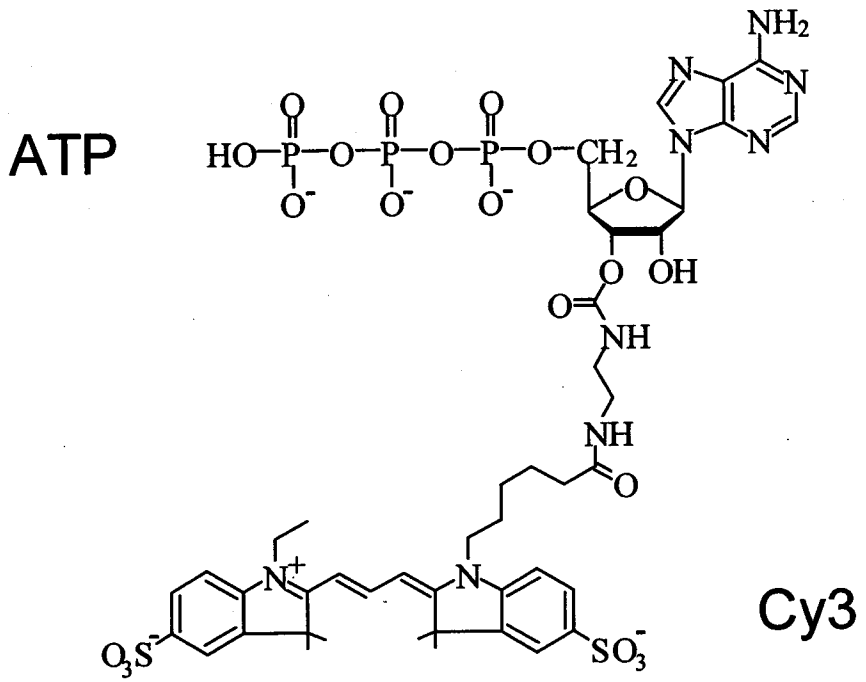


図5 蛍光性 ATP アナログ Cy3-ATP

2.4 対物レンズ型エバネッセント場照明顕微鏡

照明光学系

蛍光色素1分子を観察するために、プリズムを用いない対物レンズ型エバネッセント場照明(Axelrod, 1990)を使用する顕微鏡を構築した(図 6、Tokunaga *et al.*, to be submitted)。高開口数の対物レンズ (PlanApo, 100 ×, NA = 1.4, 無限遠補正系; オリンパス光学)と倒立顕微鏡(TMD300; ニコン)を使用した。無限遠補正系の対物レンズを使用するためにレボルバーの中にあった凹レンズは取り除いてある。ダイオード励起の Nd:YAG レーザ(model 140-0532-100; λ = 532 nm, 100 mW, 直線偏光; Lightwave Electronics, USA)からの光をコリメーションレンズ(CL)でほぼ並行にする。レーザの強度はNDフィルター(ND)で調節する。観察する水とガラスの境界面で p 偏光全反射するように、1/2 波長板(λ/2)を使い偏光面を回転させる。レーザが対物レンズの後焦点面に焦点を結ぶように2枚のレンズ(L1、L2)で集光する。レーザの開口数を絞り(A)によって 0.03 に調節した。この条件でレーザが照明する範囲は観察面上で約 50 μm × 70 μm であった。レーザは1次元のステージ上に設置したミラー(M)で反射したあと顕微鏡内に設置した特注のダイクロイックミラー(図中の DM; ASDM532; 朝日分光)で反射し対物レンズに入射する。ミラーの位置を移動させることにより落射照明と対物レンズ型エバネッセント場照明を簡単に切り替えることができる。

アンチストークス蛍光観察用のダイクロイックミラー

BODIPY FL(λ_{ex} = 503 nm, λ_{em} = 512 nm)のアンチストークス蛍光を観察するためにダイクロイックミラーを特注した。特注したダイクロイックミラーASDM532(図 7)は波長 532 nm のレーザを励起光に使用するために、532 nm での反射率が 99%以上である。Cy3 と TRIA の蛍光を観察するために 550 nm から 650 nm の透過率が 90 %以上となっている。さらに、532 nm よりも短い波長領域に発生する BODIPY FL のアンチストークス蛍光(図 7、点線)を観察するために、500 nm から 520 nm の透過率ができるだけ大きくなるように設計してある。その結果、低波長側のカットオフ波長(透過率が 50%となる波長)は 510 nm となり BODIPY FL の蛍光を観察できるダイクロイックミラーとなっている。

背景光の除去と蛍光像の選択

励起光の散乱による背景光はホログラフィックノッチフィルターによって取り除いた(HNPF-532AR-1.0; OD_{532nm}>6; Kaiser Optical System, USA)。さらに、Cy3 または TRIA の蛍光を観察するときはバンドパス蛍光フィルター590DF60(透過波長 560-620 nm; Omega Optical, USA)を BODIPY FL の蛍光を観察するときにはバンドパス蛍光フィルター510DF23(透過波長 499-521 nm; Omega Optical, USA)を使って背景光を除去した。ノッチフィルター以降の光学系の詳細は各々の実験によって異なるのでそれぞれの節と表 1で説明する。

撮影と記録、データ処理

蛍光像はイメージインテンシファイアー(C2400-80H; 浜松フォトニクス)と SIT カメラ(C2400-08; 浜松フォトニクス)の組合わせによって撮影し、S-VHS フォーマットのビデオテープに記録した。この画像を光ディスク装置(LQ-4100A; パナソニック)に複製した後、デジタル画像処理装置(DSP-200; dage-MIT, USA)によって平均化と画質の改善を行い、画像処理装置(EXCEL-2; 日本アビオニクス)によって蛍光強度の解析をおこなった。

蛍光強度を定量するときは ISIT カメラをアバランシェフォトダイオード(SPCM-200-PQ; EG & G Optoelectronics, Canada)に切り替えて蛍光フォトンをカウントした(図 8)。

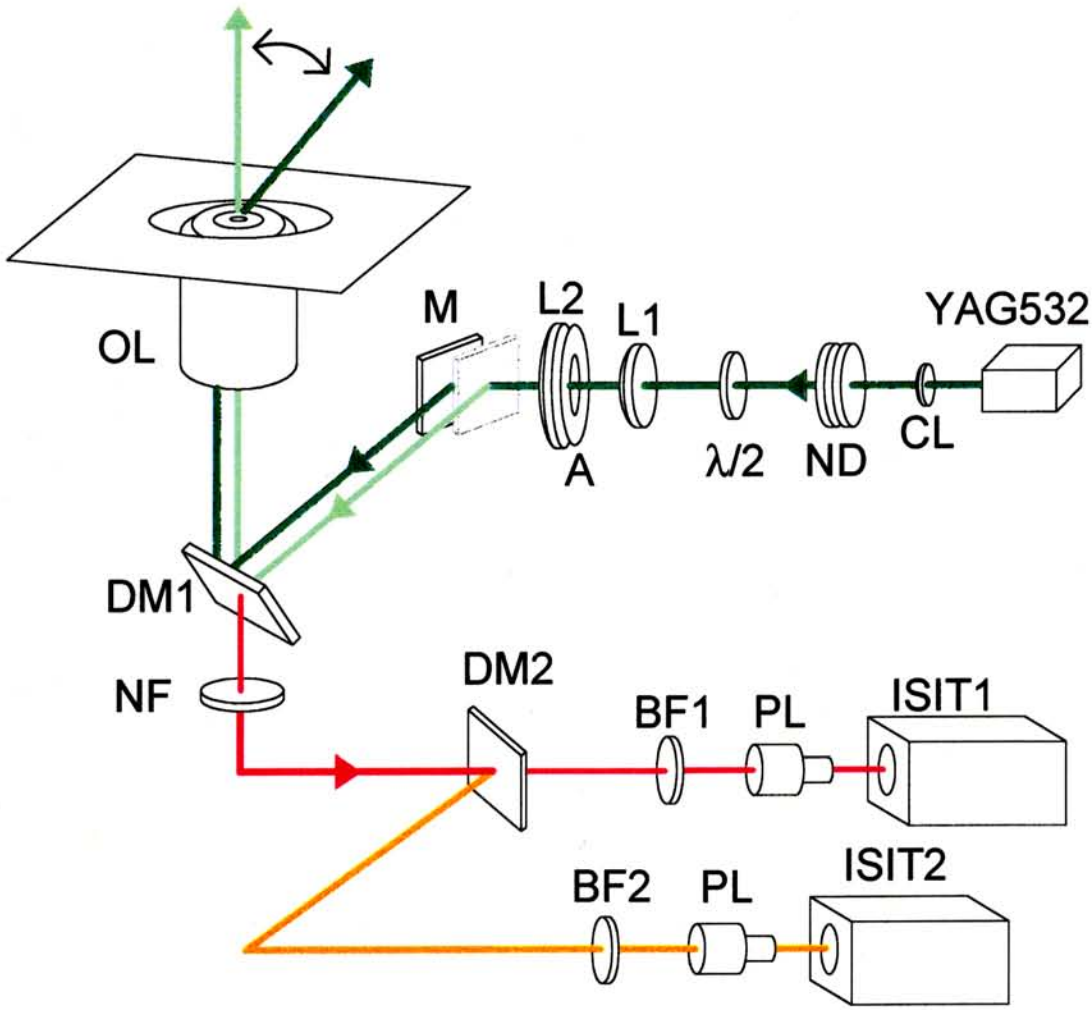


図6　1分子観察のための対物レンズ型エバネッセント場照明顕微鏡の概略図
YAG532、ダイオード励起 Nd:YAG レーザ、レーザ波長 532 nm。CL、コリメーションレンズ。ND、ND フィルター。λ/2、1/2 波長板。A、絞り。L1、L2、集光用レンズ。M、ミラー。DM1、照明用ダイクロイックミラー。OL、対物レンズ。NF、ノッチフィルター。DM2、蛍光分離用ダイクロイックミラー。BF1、BF2、バンドパス蛍光フィルター。PL、投影レンズ。ISIT1、ISIT2、イメージインテンシファイアーと SIT カメラ。ミラー M を移動させることによりレーザの入射光路の位置を動かし、落射照明と対物レンズ型エバネッセント場照明を切り替えることができる。薄い色で記述したミーラー位置は落射蛍光照明の位置。これを左に動かして対物レンズ型エバネッセント場照明をおこなう。

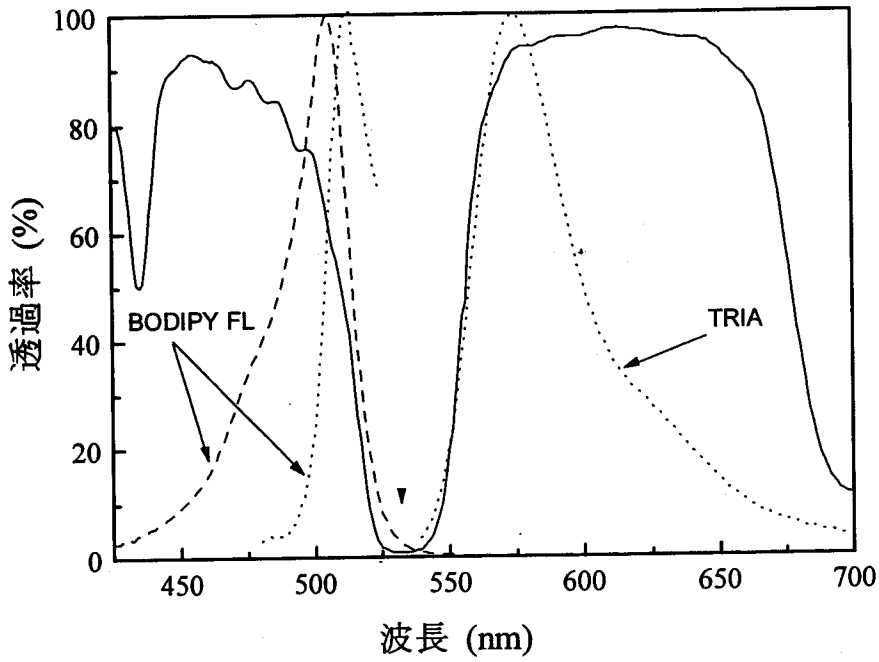


図7 蛍光色素 BODIPY FL と TRIA の蛍光スペクトルとダイクロイックミラーの透過率
実線、ダイクロイックミラーASDM532(図6のDM1)の透過率。532 nm での透過率は1%以下。点線、532 nm で励起したBODIPY FLファラシジン(λ_{ex} = 503 nm, λ_{em} = 512 nm)とTRIA(λ_{ex} = 540 nm, λ_{em} = 567 nm)の蛍光スペクトル。蛍光分光光度計(Fluorogo-2; SPEX Industries, Inc., USA)で測定した。溶液条件は色素濃度が1 μM、バッファーは25 mM プロピオン酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、20 mM HEPES, pH 7.8。蛍光強度は蛍光ピーク波長での値で規格化してある。波線、BODIPY FL ファラシジンの吸光スペクトル。ピーク波長で規格化してある。マーカーは波長 532 nm。

表1　二重標識サンプル観察用のダイクロイックミラーとバンドパスフィルターの組合わせ

	観察方法	カメラ	蛍光色素	ダイクロイックミラー	バンドパスフィルター	
				DM2	BF1	BF2
A	独立に	ISIT1	TRIA または Cy3	-	590DF60	-
		ISIT1	BODIPY FL	-	510DF23	-
B	同時に	ISIT1	TRIA または Cy3 BODIPY FL	-	-	-
C	同時に	ISIT1	TRIA または Cy3	550DRLP02	590DF60	-
		ISIT2	BODIPY FL		-	510DF23

Cy3 及び TRIA、BODIPY FL の蛍光像はダイクロイックミラーとバンドパスフィルターによって選別する。ISIT1、ISIT2、DM2、BP1、BP2 の位置は図 6を参照。組合わせ A は1台の ISIT カメラで二つの蛍光色素を別々に観察(図 9の A、図 11)、組合わせ B は二つの蛍光色素を1台の ISIT カメラで一つの画像として同時に観察(図 12)、組合わせ C は二つの蛍光色素を別々の画像として2台の ISIT カメラで同時に観察(図 13)。

2.5 蛍光観察結果

作成したエバネッセント場照明顕微鏡を使用してCy3-BDTC-S1の観察をおこなった。そして、アバランシェフォトダイオードによるフォトンカウントで対物レンズ型エバネッセント場照明を使用したときの蛍光シグナルと背景光の比を計測した。このとき、Cy3-BDTC-S1 1分子からのCy3 蛍光シグナルと Cy3-BDTC-S1 によって加水分解されている Cy3-ATP 1分子の蛍光シグナルを計測した。次に、BODIPY FL で標識したアクチンフィラメントのアンチストークス蛍光像を観察した。このとき、TRIA-S1 1分子と同時に観察できることを確認した。最後に、Cy3-ATPを使用したアクトミオシン *in vitro* 運動再構成系によりミオシン1分子による ATP 加水分解反応と ATP 加水分解反応に共役したアクチンフィラメントの滑り運動を同時に観察した。

2.5.1 蛍光色素1分子のイメージング

対物レンズ型エバネッセント場照明でもプリズム型エバネッセント場照明(Funatsu *et al.*, 1995)と同様に蛍光色素 1 分子を可視化できることを示すために、Cy3 で標識した S1 分子を対物レンズ型エバネッセント場照明顕微鏡で観察した。また、この照明方法と落射蛍光照明法による蛍光シグナル強度と背景光強度の比を測定した。

顕微鏡の検出系

使用した顕微鏡の観察系は図 8のとおり。Cy3 標識サンプルを観察するので、バンドパスフィルター590DF60(図 8の BF1、表 1の組合わせ A)を使用した。蛍光色素1分子からの定量はアバランシェフォトダイオードによりフォトンカウントをおこなった。

観察手順

観察に使用するカバーガラスは、0.1 N KOH とエタノール、蒸留水で超音波洗浄した後、蒸留水中に保存しておく。1%(v/v) 2-メルカプトエタノール(Kishino & Yanagida 1988; Harada *et al.*, 1990)を含む 25 mM プロピオン酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、20 mM HEPES, pH 7.8 の溶液で標識した Cy3-BDTC-S1 を 10 pM から 100 pM 程度に希釈する。このサンプル溶液約 5 μl を洗浄済みカバーガラスに載せ、別のカバーガラスをかぶせて端をエナメルでシールした後に顕微鏡で観察する。これらの操作は観察面へのほこりの混入を避けるためにクリーンベンチ内でおこなった。

Cy3-BDTC-S1 による Cy3-ATP 加水分解反応の観察も洗浄済みカバーガラスを使用した。観察ではすべてバッファー溶液 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 20 mM PIPES, pH 7.8(以下アッセイバッファー)を使用した。カバーガラス上に、厚さ0.3 mmのビニールの小片を約 10 mmの間隔をあけて載せる。その上に 18 mm × 18 mm のカバーガラスを載せてモーティリティチャンバーとする。1 mg/ml ビオチン化 BSA を流し表面を BSA で処理する。アッセイバッファーで吸着しなかったビオチン化 BSA を洗い流した後、1 mg/ml のストレプトアビジンを流し 10 分間待ってビオチン化 BSA に結合させる。35 pM の Cy3-BDTC-S1 を流し 5 分間待ってストレプトアビジ

ンに吸着させた後、50 nM Cy3-ATP と脱酸素系(4.5mg/ml グルコース、0.036mg/ml カタラーゼ、0.216mg/ml グルコースオキシターゼ)、1%(v/v) 2–メルカプトエタノール(Kishino & Yanagida 1988; Harada *et al.*, 1990)を含むアッセイバッファーに置き換え、カバーガラスの端をマニキュアで封印した後、加水分解反応を観察する。観察は 25°C でおこなった。

フォトンカウントをおこなう前に、S1 の蛍光像を ISIT カメラで確認しておく。ステージを動かして適当な S1 の輝点をアバランシェフォトダイオードに対応する位置に移動させる。ミラー(図 8のM)を操作し検出系をアバランシェフォトダイオード側に切り替え、フォトンカウントを開始する。蛍光色素は数秒で退色するが、バックグラウンドの光量を計測するため退色後数秒間カウントを継続する。

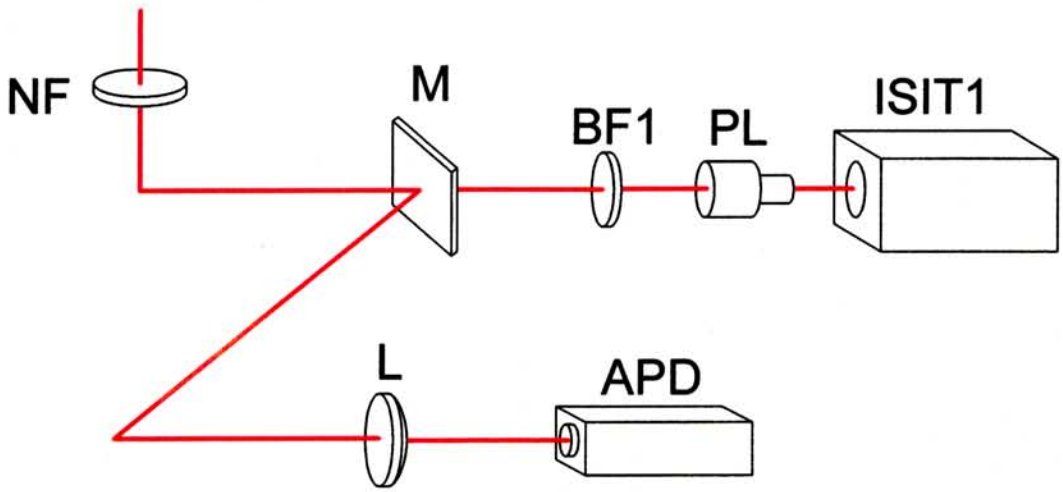


図8　蛍光色素1分子の蛍光強度定量
蛍光照明法の違いによる蛍光強度と背景光強度比計測用の検出系。図 6の NF 以降を示す。アバランシェフォトダイオードで蛍光と背景光をフォトンカウントした。M、ミラー。L、集光用レンズ。APD、フォトンカウント用アバランシェフォトダイオード。BF1、バンドパス蛍光フィルター。PL、投影レンズ。ISIT1、イメージインテンシファイアーとSITカメラの組合わせ。フィルターの組合わせは表 1の組合わせ A。

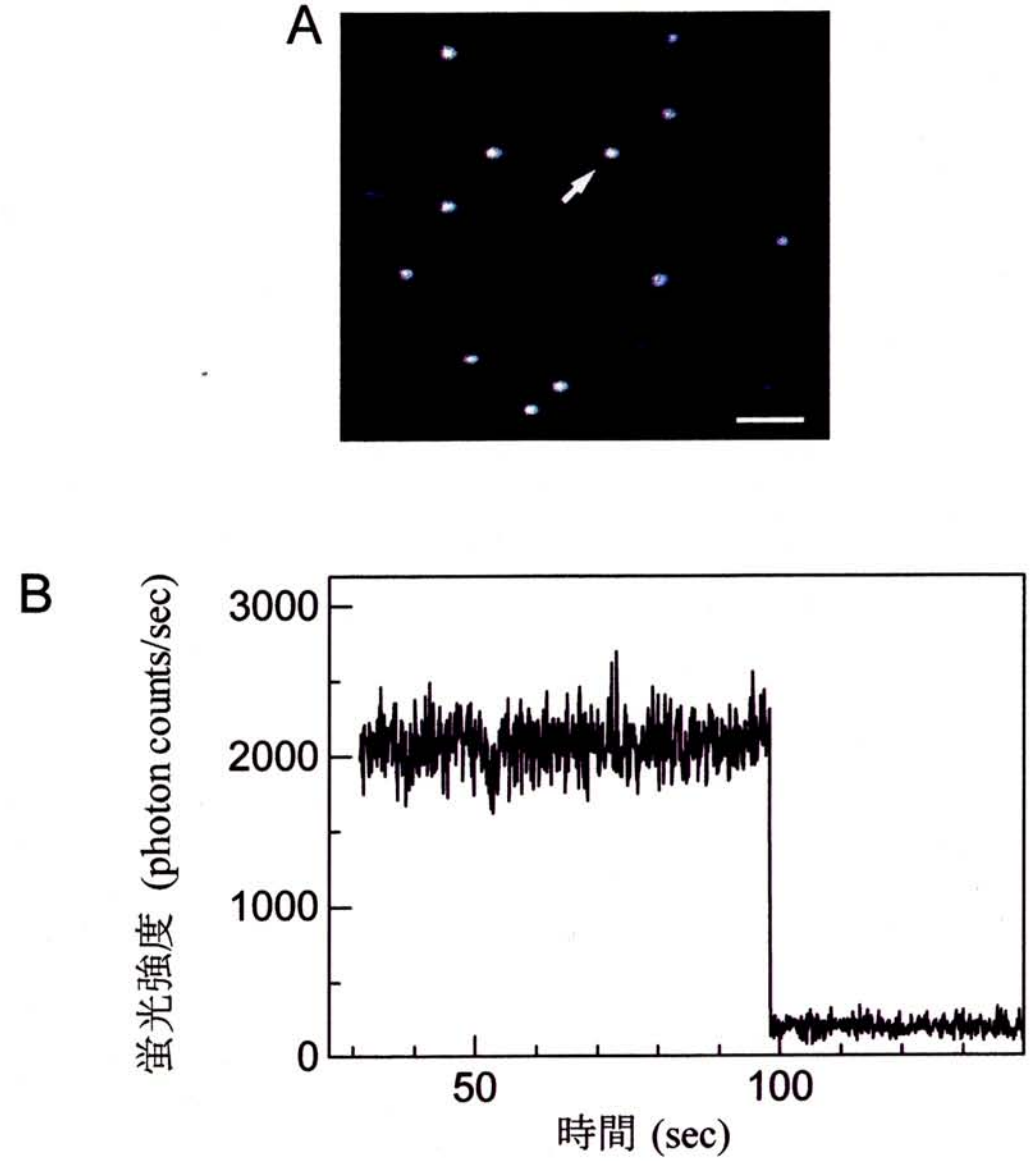


図9 Cy3-BDTC-S1 の蛍光像と蛍光強度時間変化

A、Cy3 で標識した S1 の蛍光像。照明強度は胴付け面で 1.7 mW。16 フレーム加算平均した像。スケールバーは 5 μm。B、図 A 中の矢印で示した Cy3 標識 S1 の蛍光強度時間変化。フォトンカウントのゲート時間は 0.1 秒。光照射開始時刻を時間 0 とした。

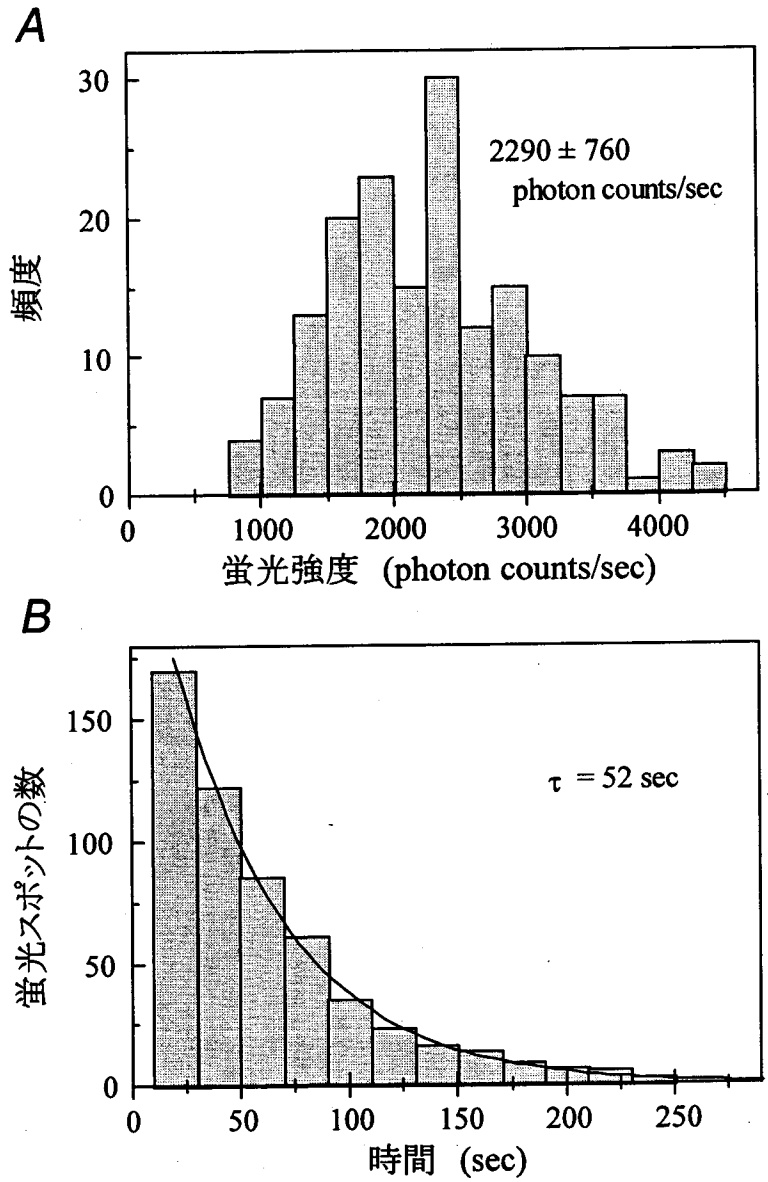


図10 Cy3-BDTC-S1 の蛍光強度と蛍光寿命

A、Cy3 で標識した S1 の蛍光強度分布。B、照明開始後、退色せずに残っている輝点の数。

表2 検出される蛍光フォトンの照明方法による違い

サンプル	照明方法	Cy3 の蛍光強度 (photon/sec)	背景光強度 (photon/sec)	蛍光/背景光
Cy3-BDTC-S1	対物レンズ型*	2290 ± 760 (169)	190 ± 20 (169)	12
	落射蛍光	730 ± 360 (36)	250 ± 20 (36)	2.9
Cy3-ATP (50 nM)	対物レンズ型*	2650 ± 650 (81)	4180 ± 600 (81)	0.63
	落射蛍光	ND	24200 ± 6900 (27)	~0.03

落射照明では Cy3-ATP 1分子を可視化できないので Cy3 の蛍光シグナルは測定できない (ND)。蛍光/背景光は Cy3-BDTC-S1 の蛍光シグナルをもとに計算した(730/24200 ≈ 0.03)。どちらの照影方法とも胴付け面での入射レーザ強度は同じ。

*対物レンズ型＝対物レンズ型エバネッセント場照明

結果－Cy3 標識 S1 1分子の蛍光像

図 9A は Cy3-BDTC-S1 1分子の画像で 16 フレーム加算平均した像である。図中の蛍光スポットおのおのが Cy3 1分子に対応する。対物レンズ型エバネッセント場照明法でもプリズム型エバネッセント場照明法と同様に蛍光色素1分子で標識したタンパク質1分子を画像化することができた。

結果－蛍光色素の退色

観察した蛍光スポットが蛍光色素1分子からの蛍光によるものであることを証明するためにアバランシェフォトダイオードを使って蛍光強度の時間変化を測定した。図9Bは図9A中の矢印で示した Cy3-BDTC-S1 蛍光スポット一つの蛍光強度時間変化である。その結果、蛍光スポットは1ゲート時間(0.1 秒)内に退色により消えさった。このことは、蛍光スポットが蛍光色素1分子であったことを示している(Funatsu *et al.*, 1995)。図 10B は照明開始後に退色せずに輝いている輝点の数を示す。退色せずに残っている輝点の数は指数関数的に減少していった。照明開始から t 秒後に退色せずに残っている輝点の数 $N(t)$を $N(t) = N_0 \exp(-t / \tau)$ で近似すると $\tau = 52$ sec となった。

結果－Cy3 1分子の蛍光強度測定

図 10A は Cy3-BDTC-S1 の蛍光強度分布を示す。アバランシェフォトダイオードにより Cy3-BDTC-S1 を示す蛍光スポットからのフォトンをカウントした。蛍光強度分布はシングルピークとなった。このことは、蛍光スポットが1分子に対応していることを示唆している。蛍光色素1分子からの蛍光の強度と背景光の強度の比を求めるために、Cy3-BDTC-S1 1分子からの Cy3 蛍光シグナルと Cy3-BDTC-S1 によって加水分解されている Cy3-ATP 1分子の蛍光シグナルを計測した。表 2は測定した蛍光強度と背景光強度を示す。対物レンズ型エバネッセント場照明における Cy3 標識 S1 の蛍光強度と背景光強度の比は 12 であった。また、Cy3-ATP 1分子の蛍光シグナルと 50 nM Cy3-ATP による背景光強度の比は 0.63 であった。

2.5.2 BODIPY FL 標識アクチンフィラメントと TRIA 標識 S1 の観察

蛋白質 1 分子とそれに相互作用するもう一つの蛋白質を同時可視化できることを示すために、TRIA-S1 と BODIPY FL 標識アクチンフィラメントの同時可視化を行った。1個の S1 分子を可視化する条件、およそ数pM~数10 pM、ではミオシンとアクチンの解離常数の関係から、ライゴールの条件でも S1 が解離してしまう。そこで、TRIA-S1 とアクチンフィラメントの間に EDC による化学架橋をおこなった。このサンプルを対物レンズ型エバネッセント場照明顕微鏡で観察した。

実験装置

使用した顕微鏡の観察系は前節(蛍光色素1分子のイメージング)で記述した通り。ホログラフィックノッチフィルター以降に設置するバンドパス蛍光フィルター(図 6の BF1)の有無によって

観察する蛍光像を切り替えた。二つの色素を別々に観察するときは表 1の組合わせ A を、1台の ISIT カメラで同時に観察するときには表 1の組合わせ B を使用した。

サンプルーS1 とアクチンフィラメントの化学架橋

S1 とアクチンフィラメントの間で 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide (EDC) により化学架橋をおこなった (Sutoh, 1983)。S1 をアクチンフィラメントにライゴール結合させるため、0.5 mg/ml (11.8 μM) アクチンフィラメントと 1.9 mg/ml (14.6 μM) S1、0.1 mg/ml (0.77 μM) TRIA-S1 を 100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM イミダゾール-HCl, pH 7.0 のバッファー中、25 °C で 30 分間反応させた。その後、1 mM の EDC を加え 25 °C で1時間反応させた。4倍量の 0.5 M NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 2%(v/v) 2-メルカプトエタノール、10 mM ATP, 50 mM イミダゾール-HCl, pH 7.0 を加えて架橋反応を停止させた後、435,000×g、4 °C において 10 分間遠心し、架橋しなかった S1 を取り除いた。アクチンと S1 の架橋産物を含む沈殿を先ほどの 2-メルカプトエタノールを含むバッファーでまろやかにとかし再度遠心にかける。アクチンの最終濃度が 0.1 mg/ml になるように沈殿を 0.1 M NaCl, 20 mM HEPES, 2 mM $MgCl_2$, pH 7.8 のバッファーに溶かす。アクチンフィラメントを標識するために、架橋産物をアクチンモノマーに換算して 2.5 μM、5 μM BODIPY FL ファラシジン (λ_{ex} = 503 nm, λ_{em} = 512 nm), 5 μM ファラシジン, 25 mM プロピオン酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、20 mM HEPES, pH 7.8 になるように溶かし、4 °C で一晩反応させた。アクチンフィラメントの蛍光強度を調節するときは BODIPY FL ファラシジンとファラシジンの濃度を変えた。

アクチンフィラメントに架橋した S1 の量を見積もるために、架橋反応停止直後のアクチン S1 架橋溶液を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた (Sutoh, 1983)。クマジー染色後、165 kDa 及び 175 kDa、130 kDa に対応するバンドをスペクトロフォトメータ (DU640; Beckman, USA) で定量し、化学架橋した S1 を最初の S1 量の 1.1%と見積もった。つまり、8.5 nM (= 0.77 μM × 1.1%) の TRIA-S1 が架橋していた。

観察手順

観察に使用するカバーガラスは、0.1 N KOH とエタノール、蒸留水で超音波洗浄した後、蒸留水中に保存しておく。観察の直前に EDC 架橋したアクチン S1 複合体を 25 mM プロピオン酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、20 mM HEPES, 1%(v/v) 2-メルカプトエタノール、pH 7.8 のバッファー溶液で 100 倍に希釈し、約 5 μl を洗浄済みカバーガラスに載せ、別のカバーガラスをかぶせて端をエナメルでシールした後に顕微鏡で観察する。これらの操作は観察面へのほこりの混入を避けるためにクリーンベンチ内でおこなった。

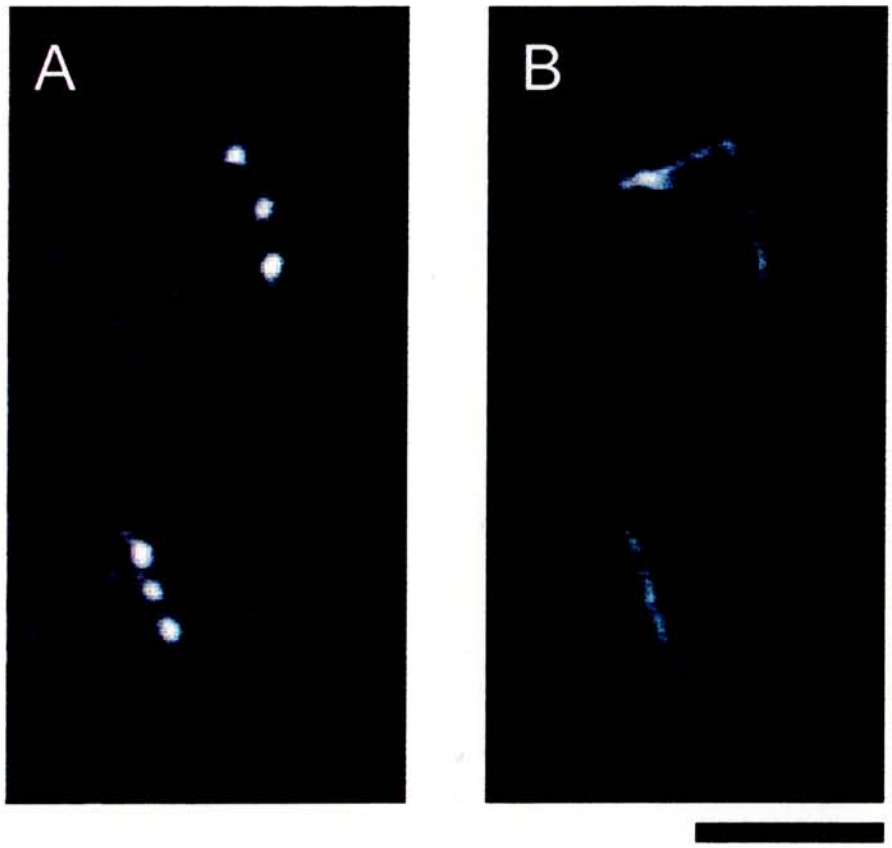


図11　EDC 架橋した TRIA-S1 と BODIPY FL アクチンフィラメントの蛍光像
蛍光像は ISIT カメラで撮影し S-VHS ビデオに記録した後、16 フレーム加算平均した。 A、テトラメチルローダミンで標識した S1 1分子。バンドパス蛍光フィルター590DF60を使用して観察。B、BODIPY FL 染色アクチンフィラメント。バンドパス蛍光フィルター510DF23を使用して観察。アクチンフィラメント(モノマーで 2.5 μM)は 5 μM BODIPY FL ファラシジンと 5 μM ファラシジンでラベルした。対物レンズ胴付け面でのレーザ強度は 5.1 mW。スケールバーは 10 μm。

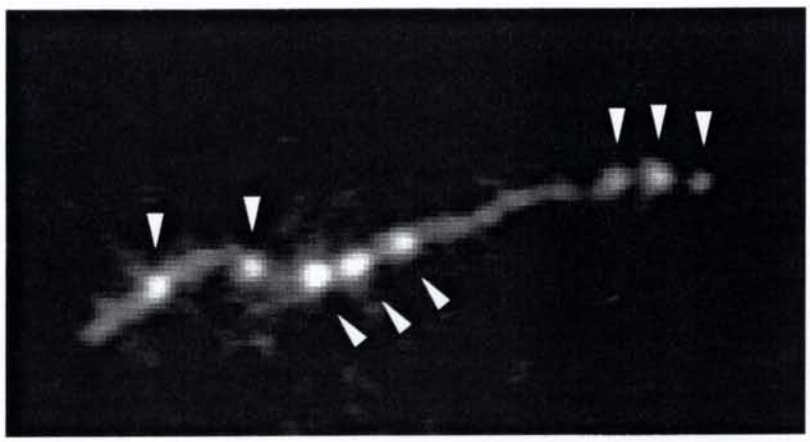


図11　BODIPY FL 染色アクチンフィラメントと TRIA-S1 の同時観察
蛍光像は ISIT カメラで撮影し S-VHS ビデオに記録した後、16 フレーム加算平均した。バンドパスフィルターを使用していないので BODIPY FL と TRIA の蛍光が同時に観察される。矢印は BODIPY FL 染色アクチンフィラメントに EDC クロスリンクされた TRIA-S1 1 分子を示す。アクチンフィラメント（モノマーで 2.5 μM）は 2.5 μM BODIPY FL ファラシジンと 7.5 μM ファラシジンでラベルした。対物レンズ胴付け面でのレーザ強度は 5.1 mW。スケールバーは 10 μm。

結果－別々観察

バンドパス蛍光フィルターを切り替えることによって二重染色サンプルを1台の ISIT カメラで別々に画像化した(表 1の組合わせ A)。図 11は架橋したアクチン S1 複合体の 532 nm で励起した蛍光像を示している。TRIA-S1 1分子(図 11、A)と BODIPY FL で標識したアクチンフィラメント(図 11、B)の蛍光像は、それぞれバンドパス蛍光フィルター590DF60 と 510DF23 を通して観察した。ダイクロイックミラーで各々の色素の蛍光を分離することはせずに、バンドパスフィルターによって蛍光の選択をおこなった。アンチストークス蛍光を観察しているにもかかわらず、BODIPY FL の蛍光がはっきりと観察された。

蛍光色素の輝点が S1 1分子に結合している TRIA 1分子によるものであるということは図 9B と同様に蛍光色素の退色から確認できた。また、輝点の存在する位置からも示された。TIRA 分子はミオシン軽鎖のシステインに特異的に結合し、S1 分子はアクチンフィラメントに化学架橋している。TRIA の蛍光像と BODIPY FL の蛍光像を重ね合わせると、TRIA の輝点の 96%が BODIPY FL 標識アクチンフィラメントの位置に存在した。このことは、TRIA の輝点が S1 に結合していることを示している。

架橋している S1 の割合は電気泳動から初めの S1 の 1.1%と求められた。TRIA で標識された S1 は 8.5 nM(= 0.77 × 1.1%)がアクチンと結合していることになる。アクチンと S1 は 1:1 の割合で結合するので、アクチンモノマーのうち 1/1400(= 8.5 nM 架橋 TRIA-S1 / 11.8 μM アクチンモノマー)が TRIA-S1 と結合している。アクチンフィラメントは 1 μm あたり 366 個のアクチン分子を含むので、3.8 μm(= 1400/366)のアクチンフィラメント上に1個の TRIA-S1 が観察されることになる。図 11の結果はこの値と良く一致している。

結果－同時観察

BODIPY FL 標識アクチンフィラメントと TRIA 標識した S1 の蛍光像を同時に1台の ISIT カメラで観察した(図 12)。ノッチフィルター以降にはダイクロイックミラーとバンドパスフィルターがないので(表 1の組合わせ B) TRIA のストークス蛍光と BODIPY FL のアンチストークス蛍光が同時にカメラに到達する。TRIA 分子(図 12の矢頭)はアクチンフィラメント上に存在した。この観察像は別々に観察したアクチンフィラメントと TRIA の像を合成したものと同じ様な像になった。

2.5.3 Cy3-ATP によるアクチンフィラメントの滑り運動

蛍光色素1分子とアクチンフィラメントの同時観察顕微鏡を用いて、1分子化学反応とそれに共役する力学反応の同時可視化をおこなった。合成ミオシンフィラメントをカバーガラス上に吸着させ、その上で BODIPY FL で標識したアクチンフィラメントを走らせた。基質として ATP と蛍光性 ATP アナログ Cy3-ATP を用いることにより、1分子化学反応を Cy3-ATP の点滅から観察し、同時にミオシンフィラメント上を走るアクチンフィラメントの滑り運動も可視化した。

実験装置

Cy3 及び BODIPY FL の蛍光を同時に2台の ISIT カメラで観察するために、ノッチフィルター以降の光学系を変更した(図 6、表 1の組合わせ C)。ダイクロイックミラーを透過してきた Cy3-ATP の蛍光と BODIPY FL アクチンフィラメントの蛍光はダイクロイックミラー550DRLP02 (DM2; Omega Optical, USA)で分けられ、各々バンドパスフィルター590DF60(図中の BF1; Omega Optical, USA)または510DF23(図中の BF2; Omega Optical, USA)を通ったあと、ISIT カメラで撮影される。二つの TV 画像間の時刻同一性を保つために、一つの画像に合成したあと、S-VHS ビデオデッキに記録した。

実験手順

シリコーンコート処理(Harada *et al.* 1990)を施した 24 mm × 32 mm カバーガラス上に、厚さ 0.3 mm のビニールの小片を約 10 mm の間隔をあけて載せる。その上に 18 mm × 18 mm のカバーガラスを載せてモーティリティチャンバーとする。25 mM プロピオン酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、20 mM HEPES, pH 7.8(以下モーティリティバッファー)中に溶かした 1 mg/ml BSA, 20 µl をモーティリティチャンバーに満たし2分間待つ。モーティリティバッファー100 µl をチャンバー内に還流させ、ガラスに吸着しなかった BSA を洗い流す。モーティリティバッファーで約 1.3 µg/ml に薄めた長いミオシンフィラメント 100 µl をチャンバーに環流し2分間待つ。モーティリティバッファー100 µl をチャンバー内に還流し、ガラスに吸着しなかった長いミオシンフィラメントを洗い流す。10 µM ATP, 10 nM Cy3-ATP, 脱酸素系(4.5mg/ml グルコース、0.036mg/ml カタラーゼ、0.216mg/ml グルコースオキシターゼ)、1%(v/v) 2–メルカプトエタノール(Kishino & Yanagida 1988; Harada *et al.*, 1990)を含むモーティリティバッファー80 µl を環流する。この、ATP を含むモーティリティバッファーで 0.1 mg/ml の BODIPY FL 標識アクチンフィラメントを 40 倍に希釈し、20 µl をモーティリティチャンバーに流し入れて観察する。

実験結果

図 13はミオシンヘッドによる Cy3-ATP 加水分解反応と BODIPY FL 標識アクチンフィラメントのミオシンフィラメント上での滑り運動を示す。両方の蛍光像を同時に実時間でクリアに観察するために2台の ISIT カメラを使用した。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点として観察されないが、ミオシンヘッドに結合したときにはその動きが止まるので、明るい輝点として観察される(図 13、左の列)。ミオシン頭部により加水分解され、Cy3-ADP として頭部から解離すると、再び激しくブラウン運動するので、輝点は観察されなくなる。蛍光による輝点の瞬きは Cy3-ATP の結合－加水分解－解離を示している(Funatsu *et al.*, 1995)。ミオシンフィラメントは蛍光標識されていないのでその存在がわからない。しかし、ミオシンヘッドによる Cy3-ATP の加水分解反応、すなわち、Cy3 1分子の点滅は直線上で起こっている。この直線が、ミオシンフィラメントを示している。同時に、BODIPY FL で染色されたアクチンフィラメントの滑り運動も観察された(図 13、右の列)。この運動も、特定の直線上で起こった。Cy3-ATP の点滅する位置と、アクチンフィラメントが滑る位置を重ねてみると、両者は同

一の直線上にあった(図 13、中央の列)。この顕微鏡により、1分子の ATP 加水分解反応とそれによって引き起こされているアクチンフィラメントの滑り運動を同時に観察することができた。

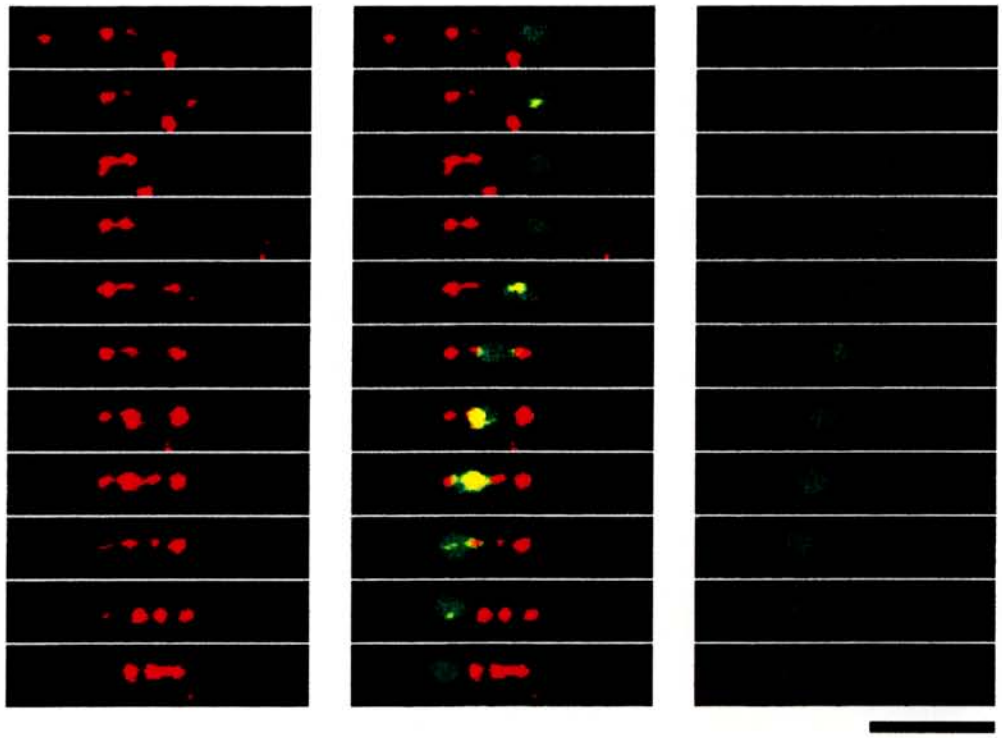


図13　Cy3-ATP を用いた BODIPY FL 染色アクチンフィラメントのモーティリティ
Cy3-ATP　1分子のミオシン頭部による加水分解（左）とミオシンフィラメント上でのアクチンフィラメント滑り運動（右）の同時観察。Cy3 及び BODIPY FL の蛍光像を2台の ISIT カメラで別々に撮影した後、S-VHS ビデオに記録し、32 フレーム平均した。各像の時間間隔は1秒。溶液条件は 10 μM ATP, 10 nM Cy3-ATP, 4.5mg/ml グルコース、0.036mg/ml カタラーゼ、0.216mg/ml グルコースオキシターゼ、1%(v/v) 2-メルカプトエタノール、25 mM プロピオン酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、20 mM HEPES, pH 7.8。胴付け面でのレーザ強度は 2.6 mW。実験温度は 30°C。スケールバーは 5 μm。

2.6 考察

対物レンズ型エバネッセント場照明を用いることにより蛍光色素1分子を水溶液中で実時間観察することに成功した。この照明方法は、すでに水溶液中で蛍光色素1分子を可視化することに使われていた、プリズム型エバネッセント場照明と同様にすぐれた照明方法である。

アンチストークス蛍光を観察することによりBODIPY FLで標識したアクチンフィラメントをはっきりと可視化することができた。その結果として、532 nm のレーザ1本と簡単な光学系で二重染色サンプルの可視化に成功した。アンチストークス蛍光観察法と対物レンズ型エバネッセント場照明を組み合わせることにより、TRIA 1分子の可視化、BODIPY FL 標識アクチンフィラメントの可視化、それら二つの同時可視化をフィルターの交換のみによって切り替えることができるようになった。BODIPY FL アクチンフィラメントとそれに結合した TRIA-S1 1分子を同時に観察することもできた。

開発した対物レンズ型エバネッセント場照明顕微鏡を使ってミオシン1分子による ATP 加水分解反応を1分子レベルで可視化することができた。さらに、BODIPY FL のアンチストークス蛍光を観察することにより ATP 加水分解反応と共役するアクチンフィラメントの滑り運動を同時に観察することができた。

2.6.1 アンチストークス蛍光の観察

BODIPY FL で標識したアクチンフィラメントを 532 nm で励起してそのアンチストークス蛍光によりアクチンフィラメントを鮮明にイメージングすることができた。この、アンチストークス蛍光観察法は本研究で使用した対物レンズ型エバネッセント場照明は勿論、データは示さなかったがプリズム型エバネッセント場照明、落射蛍光照明でも使用できた。この観察方法はコンフォーカルスキャニング顕微鏡にも応用が可能である。

BODIPY FL のアンチストークス蛍光を観察できた理由は三つある。まず第一に、励起光にレーザを使用したことである。レーザは単色性が良い光なので、ダイクロイックミラーで反射しなければならない波長領域を狭くすることができる。その結果、ダイクロイックミラーの、励起光よりも短波長側の透過率を大きくとることができた。蛍光顕微鏡で使用されてきた今までのダイクロイックミラーはアンチストークス蛍光を観察するようには設計されていない。むしろ、水銀ランプの輝線を完全に反射するように短波長側の透過率をできるだけ広い波長領域で反射するように設計されている。第二に、BODIPY FL の吸収スペクトルのピーク(503 nm)と蛍光スペクトルのピーク 512 nm が近いことである。そのため、蛍光のピークよりも少し(30 nm)長波長側の 532 nm で励起しても十分に BODIPY FL が励起された。第三に、高感度の検出カメラを使用したことにある。結果として、水銀ランプの緑の輝線による落射照明でローダミンファロイジン標識したアクチンフィラメントのストークス蛍光を観察したときと同様な画像レベルで BODIPY FL のアンチストークス蛍光を観察することができた。

アンチストークス蛍光を観察する利点は以下の通りである。

(1) 光学系が簡単になる。一般に異なる蛍光色素で標識した二重標識サンプルの観察には2波長励起をおこなう必要がある。通常、このサンプルを観察するためにはそれぞれの色素用のダイクロイックミラーに切り替えて観察する必要がある。2波長励起用のダイクロイックミラーも各種設計されているが、その設計が複雑になるばかりか、蛍光の透過率が小さくなる傾向があるので微弱な蛍光を観察する1分子レベルの観察には適さない。しかし、アンチストークス蛍光を二重染色サンプルの観察に用いることで、励起光を一波長に減らすことができ、ダイクロイックミラーの設計が簡単になる。その結果、蛍光観察中に操作する必要のある光学部品も、蛍光フィルターのみとなり操作が簡単になる。

(2) 三重、四重染色などの多重標識サンプルの同時観察に有利である。多重染色サンプルの観察では、使用できる蛍光色素の数が問題となる。限られた波長領域の中で蛍光色素の蛍光の波長領域が重複しないように蛍光色素を選択しなければならない。532 nm 1波長で励起するときに使用できる蛍光色素の選択としては、550 nm よりも長い蛍光を持つ色素を選択しなければならない。例えばローダミンと Cy5 の組合わせが、532 nm で同時に励起して蛍光を分離できる組合わせである。そこに、BODIPY FL のアンチストークス蛍光を組み合わせることにより、532 nm 1波長励起により三つの蛍光色素を同時に観察できるようになる。

(3) アンチストークス蛍光を観察することにより、サンプル中に含まれるほこりからのノイズを減少させることができる。サンプルを用意する際に混入してくる埃は蛍光を発し、それが観察には大きな邪魔となる。しかし、埃の蛍光スペクトルは励起光の波長よりもかなり長い波長領域にあるので、アンチストークス蛍光とは簡単に区別できる。

色素の選択に関しては、本研究で使用した BODIPY FL のみならず、フローレセイン(λ_{ex} = 494 nm, λ_{em} = 518 nm)でも 532 nm 励起によるアンチストークス蛍光を観察することができた。アンチストークス蛍光観察に適した蛍光色素の特徴は励起最大波長と蛍光最大波長が近い、つまり、ストークスシフトが小さいことである。

2.6.2 対物レンズ型エバネッセント場照明

現在まで蛍光色素1分子の実時間イメージングでは落射蛍光照明(Funatsu *et al.*, 1995; Sase *et al.*, 1995)か、プリズム型エバネッセント場照明(Funatsu *et al.*, 1995)が使われてきた。本研究では新たに対物レンズ型エバネッセント場照明でも蛍光色素1分子の水中実時間イメージングが可能であることを示した。

対物レンズ型エバネッセント場照明で Cy3 1分子を観察したときの蛍光強度と背景光強度の比は 12 となった(表 2)。落射蛍光照明法で観察したときの蛍光強度と背景光強度の比は 2.9 であった。落射蛍光照明法でも蛍光色素1分子を観察することはできる。しかし、観察時間を

長くするために照明強度を落とし、蛍光強度の低い条件で観察するときに、蛍光強度と背景光強度の比が 2.9 では実用性に乏しい。やはり、エバネッセント場照明による観察が1分子レベルの実験には必須であると考えられる。

対物レンズ型エバネッセント場照明の蛍光強度と背景光強度の比はプリズム型エバネッセント場照明での比およそ 200~300 (Funatsu *et al.*, 1995) よりも小さい値であるが、蛍光色素1分子を観察するには十分な値である。今回の測定はフィルターの条件などが Funatsu らの測定条件と異なるので直接比較できるものではないが、対物レンズ型エバネッセント場照明のほうが背景光が大きくなっている。この原因は対物レンズ中を励起光が通過するためと考えられる。12 という蛍光強度と背景光強度の比は蛍光色素1分子観察に十分な値であり、種々の1分子レベルの実験に応用できる。

次に、対物レンズ型エバネッセント場照明の長所を挙げる。

(1) 光学系がシンプルになる。プリズム型エバネッセント場照明では全反射を達成させるため、スライドガラスを挟んで対物レンズの反対側にプリズムを設置する必要がある (図 3、Funatsu *et al.*, 1995)。対物レンズ型エバネッセント場照明ではプリズムが必要ないので (図 4) 光学系をシンプルにできる。

(2) 照明光学系を操作する必要がない。その結果、サンプルを交換しても照明の条件に変化がない。このことは蛍光色素 1 分子の励起偏光度を測定する際に重要である。

(3) ほかの装置と組み合わせることが容易である。プリズムを設置する必要がないので対物レンズ上に空間ができ、その場所にほかの装置を設置することができる。AFM や NSOM などのクキャニング顕微鏡、ガラスニードルを使ったタンパク質超微操作装置などと組み合わせることが可能である。また、細胞表面のタンパク質を観察しながら同時にマイクロピペットによる膜電位の測定をおこなうことも可能である。

(4) サンプルの厚さを大きくできる。プリズム型エバネッセント場照明ではバッファーを挟んで対物レンズから遠い側のガラス表面を観察する。蛍光色素1分子観察に使用する対物レンズは開口数の大きいものを使用する必要があり、そのようなレンズは作動距離が短い。ガラスに挟まれたバッファーの厚みは作動距離以下、およそ 15 μm 以下となる。対物レンズエバネッセント場照明では対物レンズ側のガラスの表面を観察するので、それに接しているサンプルの厚さをいくらでも大きくできる。その結果、細胞表面に存在する蛍光色素 1 分子の可視化も可能になる。そして、カバーガラスの間に挟まれているバッファー溶液の体積を大きくできるので、その中に含まれている基質の絶対量を大きくできる。また、照明光が照射する表面を観察できるので、内部が不透明なサンプルの表面を観察することも可能である。

(5) 最終レンズの焦点距離が短いので、レーザの集光スポットのサイズを小さくできる。レーザが集光される時のスポットサイズは集光するレンズの焦点距離によって決まる。プリズム型

エバネッセント場照明ではプリズムを使用する関係上、集光用のレンズ(図 3)の焦点距離を 50 mm 程度よりも短くできない。その結果レーザを小さく集光することができず、水とガラスの境界面での照射面積も 100 × 100 μm 程度までしか絞り込むことができない。対物レンズ型エバネッセント場照明では最終的にレーザを絞り込むレンズが開口数 1.4 と結像特性に優れたレンズである。その結果、照明用のレーザを絞り込むことが可能である。集光レンズの直前に置いた絞り(図 6の A)を調節する事により照明範囲を直径 1 μm 程度にまで絞り込むことができる。蛍光試料は退色の問題が深刻であるので、不必要な退色はさけなければならない。照明範囲を絞り込むことにより不必要な退色を抑えることができ、なおかつ、励起光による背景光の増加を抑えることができる。

(6) 実験操作が簡単である。サンプル交換のたびにプリズム型エバネッセント場照明のようにプリズムを操作する必要がないので実験操作が簡単である。照明用光学系を操作する必要が無いので、毎回同じ実験条件での観察が可能である。また、プリズム型エバネッセント場照明ではサンプルを固定するガラスに高価な石英スライドガラスを使用する必要があったが、対物レンズ型エバネッセント場照明では通常使用されている安価なカバーガラスを使用することができる。その結果ランニングコストも安い。

その反面、プリズム型エバネッセント場照明に対して不利な点は、レーザ光の入射角を大きく取れないことである。その結果、エバネッセント光のしみ出し深さが、300 nm 程度になってしまう(図 2)。この値は、プリズム型エバネッセント場照明で入射角 85°に設定したときの 90 nm に比べてだいぶ大きな値となっている。ただし、このことは蛍光色素1分子観察の障害とは成らない。対物レンズ型エバネッセント場照明では光軸系の調節がプリズム型に比べて多少複雑である。

結論として、対物レンズ型エバネッセント場照明は蛍光色素1分子観察に十分実用的であるばかりか、プリズム型エバネッセント場照明よりも使い勝手がよい。

2.6.3 蛍光色素 1 分子とアクチンフィラメントの同時可視化

蛋白質 1 分子とフィラメント状のポリマーの同時観察はモーター蛋白質分子の動作機構を研究する上で重要な手段となる。生体分子は往々にして他の生体分子やリガンドと相互作用することによりその機能を果たすので、生体分子とそれが相互作用している分子を同時に可視化することが重要である。本研究では TRIA 標識した S1 とアクチンフィラメントの同時観察をおこなったが、この同時観察法は他のモーター蛋白質分子、たとえばキネシンと微小管の研究にも応用できる。最近、RNA ポリメラーゼと DNA 間の相互作用が 1 分子レベルで研究され始めている。本研究で開発したアンチストークス蛍光を使用した同時観察顕微鏡は RNA ポリメラーゼや他の DNA と相互作用する蛋白質の研究に応用可能である。

本研究で開発した顕微鏡は蛍光性ヌクレオチドアナログを用いた 1 分子レベルの研究にも応用可能である。すでに、我々は蛍光性 ATP アナログの Cy3-ATP (Tokunaga *et al.*, to be

submitted)が 1 分子化学反応の可視化に有効であることを報告した(Funatsu *et al.*, 1995)。本研究では 1 分子 ATPase 反応とそれに共役するアクチンフィラメントの滑り運動を同時に可視化することに世界で初めて成功した。アクチンミオシン系以外にも、ATP や GTP の関係する酵素分子反応はたくさんある。蛍光性のヌクレオチドアナログと蛋白質の同時可視は、1分子酵素反応とそれに共役して起こる様々な反応の同時可視化を可能にする。この同時可視化は分子メカニズムを解明する有効な手段となるだろう。

3 蛍光色素1分子偏光測定

蛋白質分子の構造変化をその活性を保ったまま1分子レベルで検出するために、蛍光色素1分子の励起の偏光度を測定できる顕微鏡を開発した。はじめに、蛍光色素の蛍光の偏光度ではなく励起ベクトルの偏光度を測定した理由を述べる。次に、実際に開発した顕微鏡について説明する。この顕微鏡を用いて、ミオシンS1のSH1に結合したTRIA、S1の調節軽鎖に結合したTRIAそして、軽鎖にTRIAを結合しアクチンフィラメントとライゴール結合状態にあるS1でのTRIA、各々のTRIAの偏光度のゆらぎを測定した。その結果、SH1に結合したTRIAは堅く結合しているが、軽鎖に結合しているTRIAはゆらぎが大きいこと、そのゆらぎの原因が色素のゆらぎのみによるものではなく、ミオシンS1の構造のゆらぎを反映しているという結論を得た。

3.1 偏光度測定の理論的計算

この節では蛍光色素の偏光度を1分子レベルで計測するときの問題点とそれを解決するために取るべき方法を述べる。

3.1.1 対物レンズによる屈折

蛍光色素1分子の顕微鏡観察には大きな開口数、NA=1.4、を持つ対物レンズでの観察が必要条件であるが、開口数の大きな対物レンズで観察すると蛍光の偏光面が乱される。レンズによって蛍光を観察すると放出される蛍光の電場ベクトルの向きは屈折により変化する。この効果により物体空間にある蛍光ダイポールの向きと像空間に投影されたときの蛍光ダイポールの向きが大きく異なる場合がある。特に、開口数の大きな対物レンズを使用したときにその効果が大きい。

蛍光色素のダイポールが対物レンズで回折されるときの効果はAxelrodにより記述されている(1979)。物空間にあるベクトル$\{x, y, z\}$が対物レンズによる回折のため像空間で$\{x^0, y^0, z^0\}$を持つとする(図14)。対物レンズ上の点Pを透過したときの屈折の効果による変換は

$$\begin{pmatrix} x^0 \\ y^0 \\ z^0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(-\phi) & -\sin(-\phi) & 0 \\ \sin(-\phi) & \cos(-\phi) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos(-\theta) & -\sin(-\theta) \\ 0 & \sin(-\theta) & \cos(-\theta) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos\phi & -\sin\phi & 0 \\ \sin\phi & \cos\phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix}$$

$$= \begin{pmatrix} \cos\theta\sin^2\phi + \cos^2\phi & \cos\theta\sin\phi\cos\phi - \sin\phi\cos\phi & \sin\sigma\cos\phi \\ \cos\theta\sin\phi\cos\phi - \sin\phi\cos\phi & \cos\theta\cos^2\phi + \sin^2\phi & \sin\theta\cos\phi \\ -\sin\theta\sin\phi & -\sin\theta\cos\phi & \cos\theta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix}$$

と表される。ここで角ϕとθは点Pを示す角で図14に記述してある。

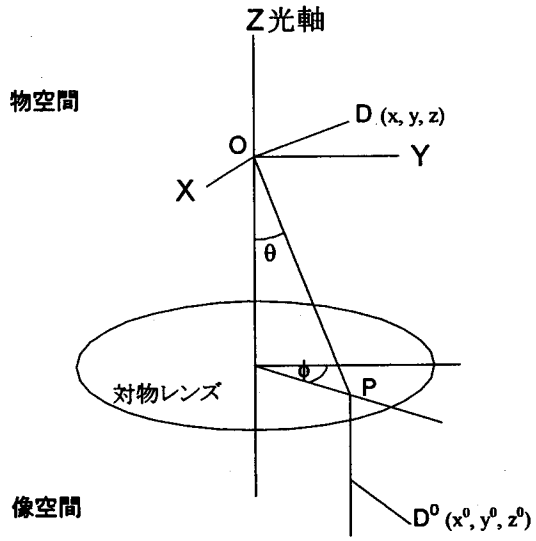


図14 対物レンズによる屈折
物空間(対物レンズ上方)にあるダイポールD(*x*, *y*, *z*)が対物レンズ上の点Pを通って像空間に進みD⁰(*x*⁰, *y*⁰, *z*⁰)になる。

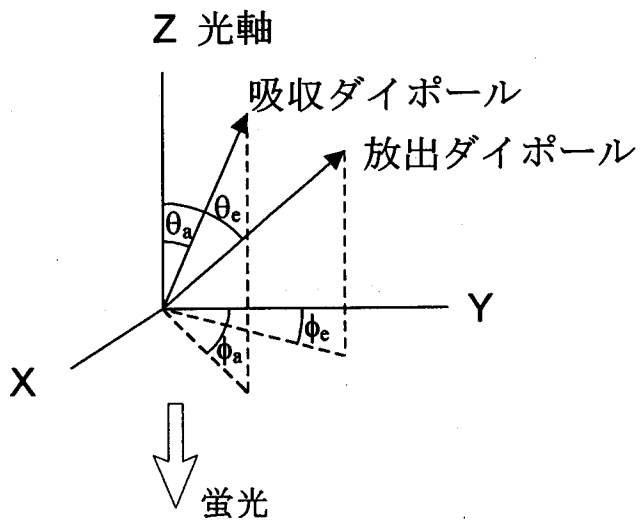


図15 蛍光色素の吸収ダイポールと放出ダイポール
蛍光色素のダイポールを二つの角θとϕで定義する。

3.1.2 対物レンズを通して観察される蛍光強度

物空間にある蛍光色素の吸収ダイポールと放出ダイポールをそれぞれ二つの角で定義する(図 15)。動かない単位強度の放出ダイポールの成分を

$$\left(x_e,\ y_e,\ z_e\right)=\left(\sin\theta_e\sin\phi_e,\ \sin\theta_e\cos\phi_e,\ \cos\theta_e\right)$$

とする。この放出ダイポールによって放出された蛍光を開口数NA=1.4を持つ対物レンズで観察する。簡単のために、蛍光の放出は角度に依存せずに一定であるとする。そのとき X 軸及び、Y 軸それぞれに平行な偏光子を通して観察される蛍光強度 I_x、I_y はそれぞれ、

$$I_x=\int_{\theta=0}^{\theta=\sigma_0}\sin\theta d\theta\int_{\phi=0}^{\phi=2\pi}d\phi\ (x_e^{\,0})^2$$
$$I_y=\int_{\theta=0}^{\theta=\sigma_0}\sin\theta d\theta\int_{\phi=0}^{\phi=2\pi}d\phi\ (y_e^{\,0})^2$$

と表される。$x_e^{\,0}$と$y_e^{\,0}$は対物レンズによる回折の後の成分で、46ページの式によりx_eとy_eを変換したものである。この積分を計算すると

$$I_x=k_c x_e^{\,2}+k_b y_e^{\,2}+k_a z_e^{\,2}$$
$$I_y=k_b x_e^{\,2}+k_c y_e^{\,2}+k_a z_e^{\,2}$$

となる。k_a、k_b、k_cはそれぞれ

$$k_a=\frac{\pi}{3}\left(3-2\cos\sigma_0-\cos2\sigma_0\right)\sin^2\frac{\sigma_0}{2}$$
$$k_b=\frac{\pi}{12}\left(3-4\cos\sigma_0+\cos2\sigma_0\right)\sin^2\frac{\sigma_0}{2}$$
$$k_c=\frac{\pi}{4}\left(11+4\cos\sigma_0+\cos2\sigma_0\right)\sin^2\frac{\sigma_0}{2}$$

とあらわされる。ここで、σ_0は対物レンズの開口数NAにより

$$NA=n\sin\sigma_0$$

と定義される数である。k_aは光軸に平行な成分の寄与、k_bは偏光子に垂直な成分の寄与、そしてk_cは偏光子に平行な成分の寄与を示す。対物レンズの開口数に対してプロットすると、図16となる。偏光子に平行な成分(k_c)からの寄与が大部分を占めるが、対物レンズの開口数が大きくなると、光軸に平行な成分(k_a)の蛍光も対物レンズの回折により観察されてくる。

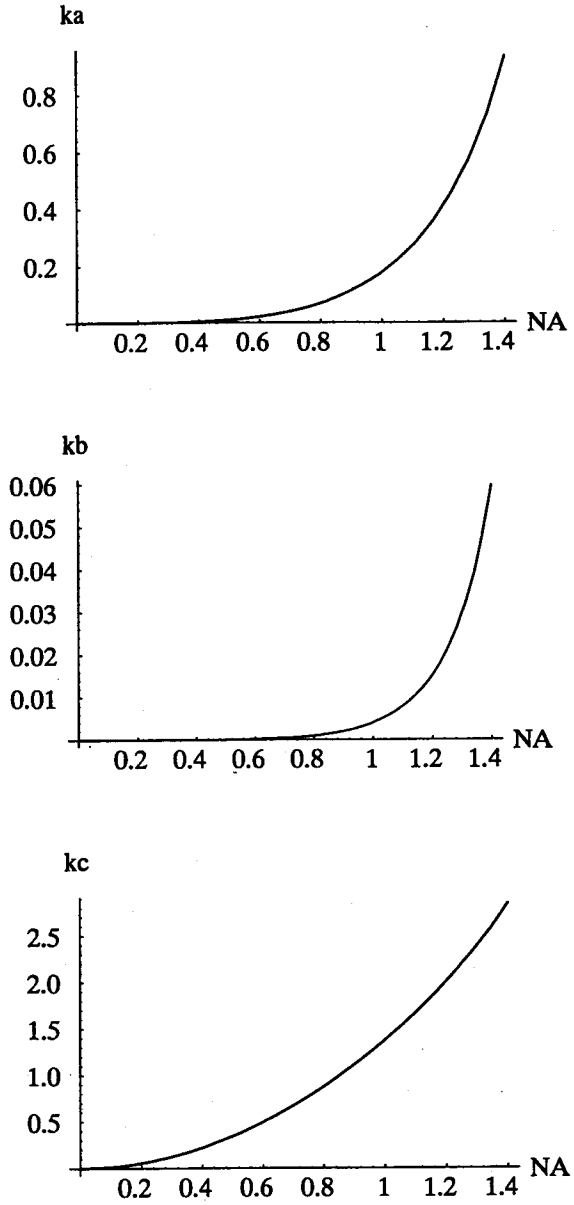


図16 観察される蛍光強度の係数
対物レンズで観察される蛍光の偏光成分を示す係数。ガラスの屈折率を 1.52 として計算。

3.1.3 放出の偏光度

以上の Axelrod の計算を元に、動かない蛍光色素1分子の蛍光放出の偏光度 P を計算すると

$$P=\frac{I_x-I_y}{I_x+I_y}=\frac{(k_b-k_c)\sin^2\theta_e\cos 2\phi_e}{2k_a\cos^2\theta_e+(k_b+k_c)\sin^2\theta_e} \qquad \text{数式 1}$$

となり、角 θ_e と ϕ_e に依存する。この値を図示すると図 18となる。

3.1.4 吸収の偏光度

吸収ベクトルを

$$(x_a,\ y_a,\ z_a)=(\sin\theta_a\sin\phi_a,\ \sin\theta_a\cos\phi_a,\ \cos\theta_a)$$

とする。s偏光全反射でエバネッセント場を形成すると、エバネッセント場の電場ベクトルはガラス面に平行となる。二つのレーザによって X 軸と Y 軸に平行な電場を持つ二つのエバネッセント場を形成する(図 17)。おのおののエバネッセント場によって蛍光色素が励起される確率は

$$p_{ax}=k\sin^2\theta_a\sin^2\phi_a$$
$$p_{ay}=k\sin^2\theta_a\cos^2\phi_a$$

となる。おのおのの励起によって観察される蛍光強度は、

$$\begin{aligned}{}_xI&=p_{a_x}I_x+p_{a_x}I_y\\&=p_{a_x}(k_c x_e^{\,2}+k_b y_e^{\,2}+k_a z_e^{\,2})+p_{a_x}(k_b x_e^{\,2}+k_c y_e^{\,2}+k_a z_e^{\,2})\\{}_yI&=p_{a_y}I_x+p_{a_y}I_y\\&=p_{a_y}(k_c x_e^{\,2}+k_b y_e^{\,2}+k_a z_e^{\,2})+p_{a_y}(k_b x_e^{\,2}+k_c y_e^{\,2}+k_a z_e^{\,2})\end{aligned}$$

となり吸収の偏光度 Q は、

$$Q=\frac{{}_xI-{}_yI}{{}_xI+{}_yI}=-\sin 2\phi_a \qquad \text{数式 2}$$

となる。これを図示すると図 19のようになる。

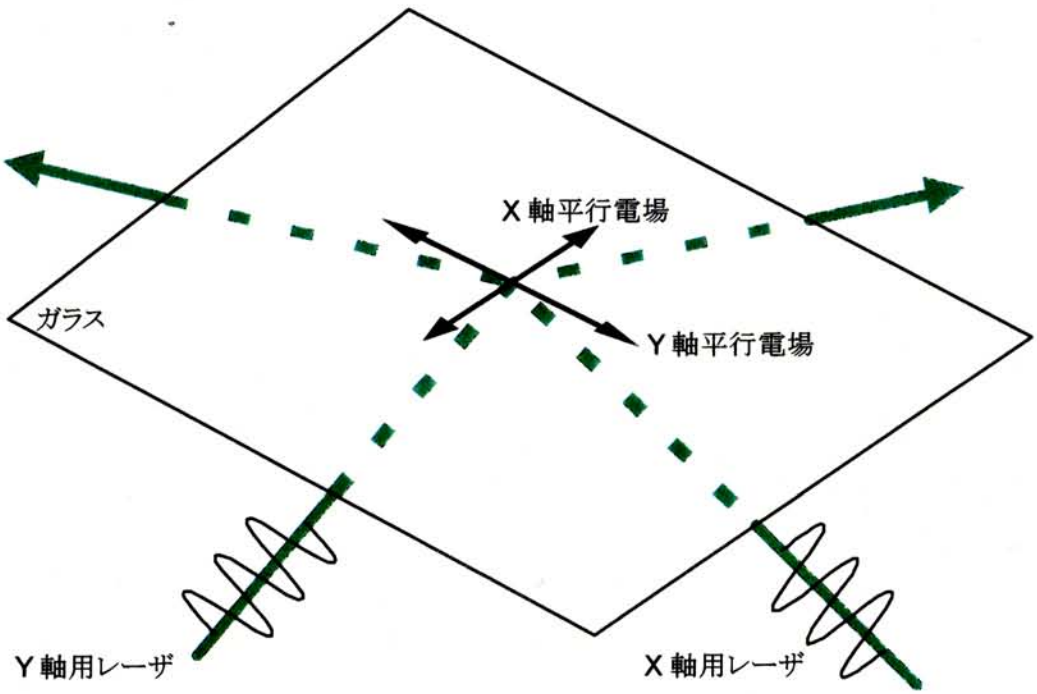


図17　二つのエバネッセント場による蛍光色素の励起
カバーガラス下、対物レンズ側から二本のレーザが入射し、ガラスと水の境界面で対物レンズ方向に全反射する。このとき二つのエバネッセント場が発生する。おのおののエバネッセント場の電場ベクトルは水とガラスの境界面に平行で、かつお互いが垂直に交わる。

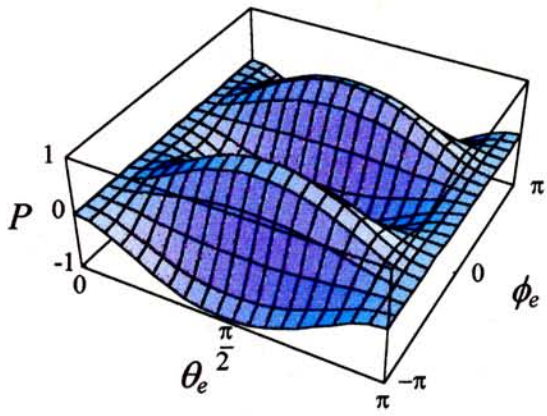


図18 蛍光放出の偏光度
蛍光放出の偏光度は放出ダイポールの二つの角度に依存する。

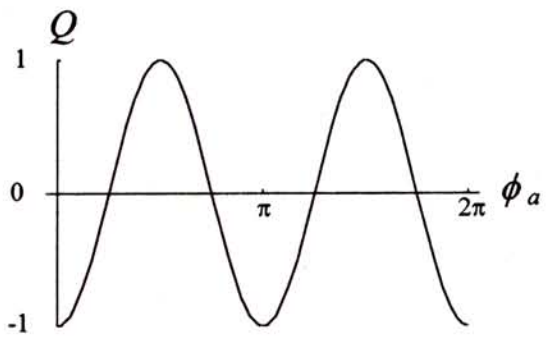


図19 吸収の偏光度
吸収の偏光度は角 ϕ_a にのみ依存する。

3.1.5 結論:何をどう測定すればよいのか

蛍光色素の偏光度からその向きを観察する方法として、励起の偏光度を測定する方法と蛍光の偏光度を測定する方法がある。1分子レベルでの偏光測定では高開口数の対物レンズによる観察が必須である。対物レンズによる回折の効果として、蛍光色素1分子の偏光度は、励起の偏光度は方位角(ϕ)にしか依存しないが、蛍光放出の偏光度は方位角(ϕ)と極角(θ)の両方に依存する。

蛍光偏光度 Q の式と励起偏光度 P の式を比較してみる。ダイポールが光軸に対し垂直に位置するとき、つまり、θが$\pi/2$のとき、Qの分母第一項は0となる。なおかつ、$k_b << k_c$なので$Q \approx P$となる。θが0またはπに近づくにつれてQの分母第1項が無視できなくなり、Qの値は0に近づく。物体空間にあるダイポールの光軸に平行な成分は回折により像空間に進行したときにX軸とY軸に等しい成分を持つようになる。このことがQの値が減少する原因である。

蛍光色素1分子の偏光度を測定する場合には励起の偏光度を測定すると、極角(θ)に依存して偏向度の絶対値が減少することなく測定でき、また、得られた結果の解釈も容易である。よって、本研究では蛍光色素1分子の励起の偏光度を測定した。

3.2 偏光測定装置とサンプル

3.2.1 タンパク

アクチンフィラメント及び S1

S1 とアクチンフィラメントの調整は19ページで記述したものと同じである。

TRIA による S1 の SH1 標識

S1 の SH1 を TRIA (T-6006; Molecular Probes, USA)で標識した(以下 TRIA-SH1-S1)。50 μM S1, 50 μM TRIA を 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 のバッファー中、0°C において反応させる。2時間後に 1.25 mM DTT を加え反応を停止しする。反応しなかった色素は Superose 6 (Pharmacia, Sweden)カラムにより、0.1M KCl, 10mM PIPES, 1mM $MgCl_2$ のバッファーを用いて取り除く。この条件で 90~100%の S1 が標識されていた。

TRIA による RLC の標識

TRIA で cgmRLC を標識した S1(以下 TRIA-cgmRLC-S1)は19ページで記述したものと同じである。

S1 とアクチンフィラメントの化学架橋

TRIA-cgmRLC-S1 とアクチンフィラメントの架橋は34ページで記述したものと同じである。

3.2.2 標準サンプル

顕微鏡をキャリブレーションする際に使用する蛍光標準サンプルとして直径が 0.01 μm、0.03 μm、0.1 μm の蛍光ラテックスビーズ(L-5192, L-5202, L-5222; λ_{ex}=530 nm、λ_{em}=560 nm; Molecular Probes, USA)を使用した。

3.2.3 顕微鏡

励起偏光測定顕微鏡

対物レンズ型エバネッセント場照明顕微鏡(22ページ)に励起光を2本にする光学系を組み込み、励起ベクトルの方向を時間によって切り替えられるようにした(図 20)。コリメートされ強度を調整されたレーザはポッケルセル(EO)に入射する。ポッケルセルはセルの両端にかけた電圧に比例して透過している光の偏光面を回転させる光学素子である。ポッケルセルの後ろには偏光ビームスプリッターを設置してある(PB1)。偏光ビームスプリッターを透過するような偏光面と反射するような偏光面を切り替えることにより、1本のレーザの光路を2方向に切り替えることができる。2方向のレーザの励起の効率が等しくなるようにキャリブレーションする必要があるので片方の光路には 1/2 波長板(λ/2)と偏光ビームスプリッター(PB2)が設置してある。2本のレーザは各々レンズ(L1、L2)で集光した後、ビームスプリッター(BS)で光路を同じくするが、このときの偏光面は互いに垂直の関係にある。一方のビームはミラー(M)の移動によって、もう一方のレーザはビームスプリッター(BS)の移動によって落射照明から対物レンズ型エバネッセント場照明に切り替えられる。各々のレーザはカバーガラスと水の境界面で s 偏光反射する。結果として、2本の s 偏光エバネッセント場が互いに垂直な向きで試料面に発生する(図 17)。

出てきた蛍光はバンドパス蛍光フィルターを使い(表 1の組合わせ B)、イメージインテンシファイアーと SIT カメラの組合わせで観察した。また、ミラー(M)を切り替えてアバランシェフォトダイオード(図中の APD; SPCM-200-PQ; EG & G Optoelectronics, Canada)でフォトンカウントをおこなった。S1 の像はレンズ(L3)によってアバランシェフォトダイオードの受光面に結像する。アバランシェフォトダイオードの受光面に対する総合倍率は 203 倍である。アバランシェフォトダイオードの受光面の大きさは200 μmなので、物体面上では1 μmに対応する。アバランシェフォトダイオードの出力はコンピュータ(PC-9801; NEC)に組み込んだパルスカウンター(M-3979; 浜松フォトニクス)で計測した。

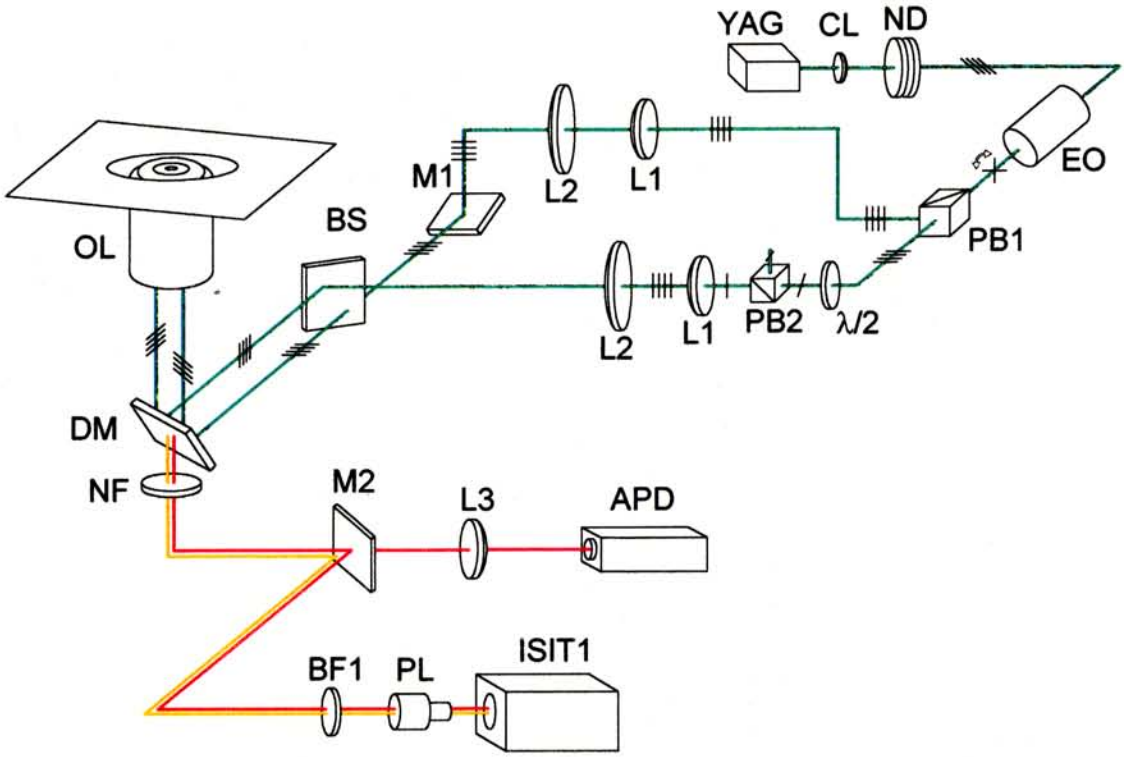


図20　1分子励起偏光顕微鏡

1分子の励起の偏光を測定する顕微鏡。YAG、ダイオード励起Nd:YAGレーザ、波長532 nm。CL、コリメーターレンズ。ND、ND フィルター。このうち1枚はソレノイドに取り付けられていてスイッチにより瞬時に光路からの出し入れができる。EO、ポッケルセルによる E/O モジュレータ。PB1、偏光ビームスプリッター。λ/2、光強度調整用 1/2 波長板。PB2、光強度調整用偏光ビームスプリッター。A、絞り、L2 の右にあるがこの図では省略。L1、L2、集光用レンズ。M1、照明方法切り替え用ミラー。BS、ビームスプリッター、二本のレーザを合成する。DM、ダイクロイックミラー。OL、対物レンズ。NF、ノッチフィルター。M2、検出系切り替え用ミラー。BF1、バンドパス蛍光フィルター。PL、投影レンズ。ISIT1、イメージインテンシファイアーと SIT カメラ。L3、蛍光集光用レンズ。APD、アバランシェフォトダイオード。レーザ光軸上の黒い線はレーザの電場ベクトルの向きを示す。

励起偏光測定におけるデータ処理の方法

蛍光色素は互いに直角の向きを持った s 偏光エバネッセント場によって励起される(図 17)。各々の電場によって励起された時に放出される蛍光を測定しなければならないので、両方の電場で同時に励起することはできない。そこで、E/O モジュレータにより電場方向を切り替え、画面に対し、X 軸に平行な s 偏光エバネッセント場と Y 軸に平行な s 偏光エバネッセント場を交互に切り替えて蛍光色素 1 分子を励起する。今回の計測では 50 ms ごとに(つまり 10 Hz で)切り替え、それぞれに対応する蛍光をカウントした(図 21)。励起の偏光度はフォトンカウントのゲート時間の2倍(100 ms)で1点のデータが測定できることになる。

励起光強度のキャリブレーション

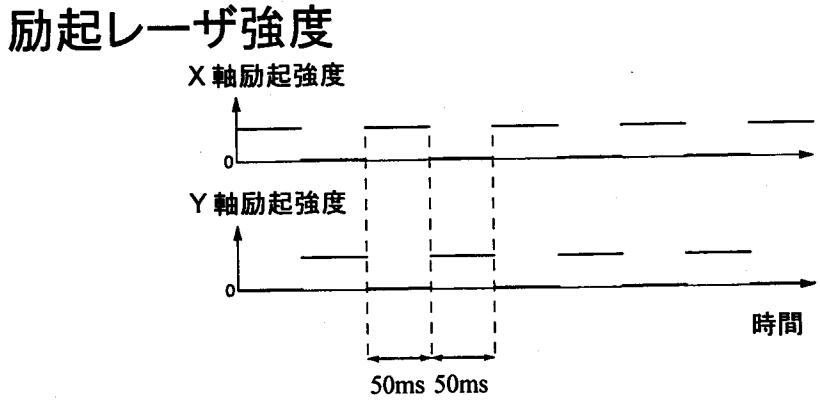
レーザの強度分布は一般にガウシアン分布であり、光強度が空間的に一定ではない。対物レンズ型エバネッセント場照明でも励起光の強度は照明エリア全体で一定ではない。よって、物体面のアバランシフォトダイオードに対応する点で X 軸のエバネッセント場と Y 軸のエバネッセント場による励起強度が等しくなるようにレーザの強度を補正する必要がある。今回は、片方のレーザ強度を 1/2 波長板と偏光ビームスプリッター(図 20の λ/2 と PB2)を用いることにより調整した。

励起光強度調整のために蛍光ビーズの偏光度を測定した。ビーズを ISIT でモニターしながらステージを操作し、アバランシェフォトダイオードに対応する位置にビーズを移動させる。観察系の光路をアバランシェフォトダイオード側に切り替えてフォトンカウントを開始する。このときの X 軸エバネッセント場励起による蛍光のカウント ${}_xI$ と Y 軸エバネッセント場励起による蛍光のカウント ${}_yI$ を記録した。30 個程度のビーズについて計測した後、${}_xI$ と ${}_yI$ をプロットし、その傾きを求める。傾きが1となるように一方のレーザ強度を調節した。

図 22にキャリブレーションの結果を示す。直径 0.1 μm では良く直線性が保たれている。ビーズの直径が小さくなると色素ダイポールの向きのばらつきが大きくなるので励起偏光度が 0 でないビーズが多くなるが傾きは 1 である。

3.2.4 1分子偏光度測定手順

観察に使用するカバーガラスは、0.1 N KOH とエタノール、蒸留水で超音波洗浄した後、蒸留水中に保存しておく。観察の直前に TRIA-SH1-S1、TRIA-cgmRLC-S1、EDC 架橋したアクチンと TRIA-cgmRLC-S1 複合体を 25 mM プロピオン酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、20 mM HEPES, 1%(v/v) 2-メルカプトエタノール、pH 7.8 のバッファー溶液で TRIA 濃度が約 50 pM になるよう希釈し、約 5 μl を洗浄済みカバーガラスに載せ、別のカバーガラスをかぶせて端をシールした後に顕微鏡で観察する。これらの操作は観察面へのほこりの混入を避けるためにクリーンベンチ内でおこなった。



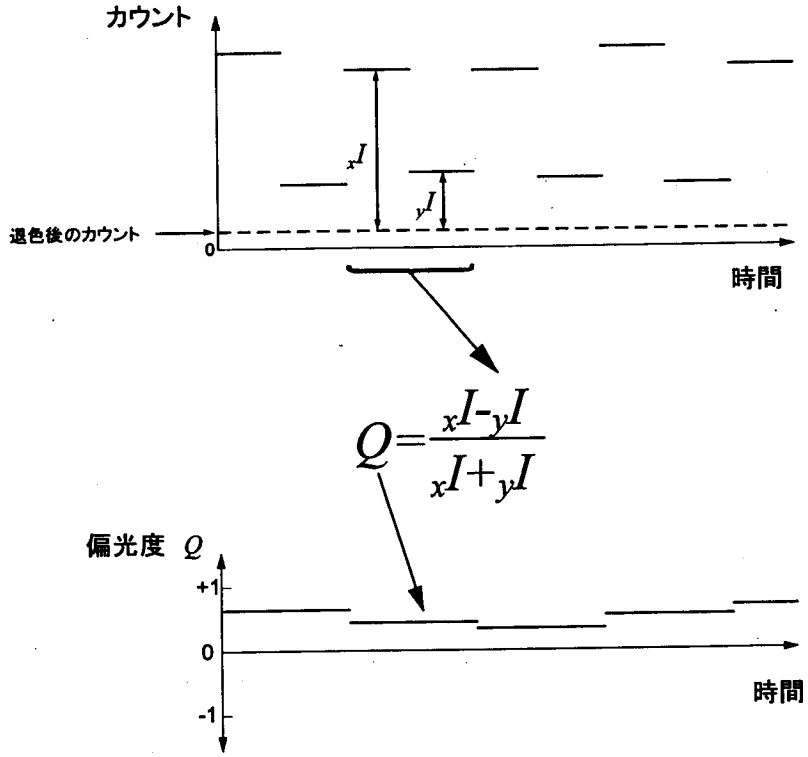


図21 偏光度の計算方法
励起のレーザは 50ms ごとに切り替える。それぞれの励起による蛍光をカウントし、その値から蛍光色素1分子の励起の偏光度を計算する。

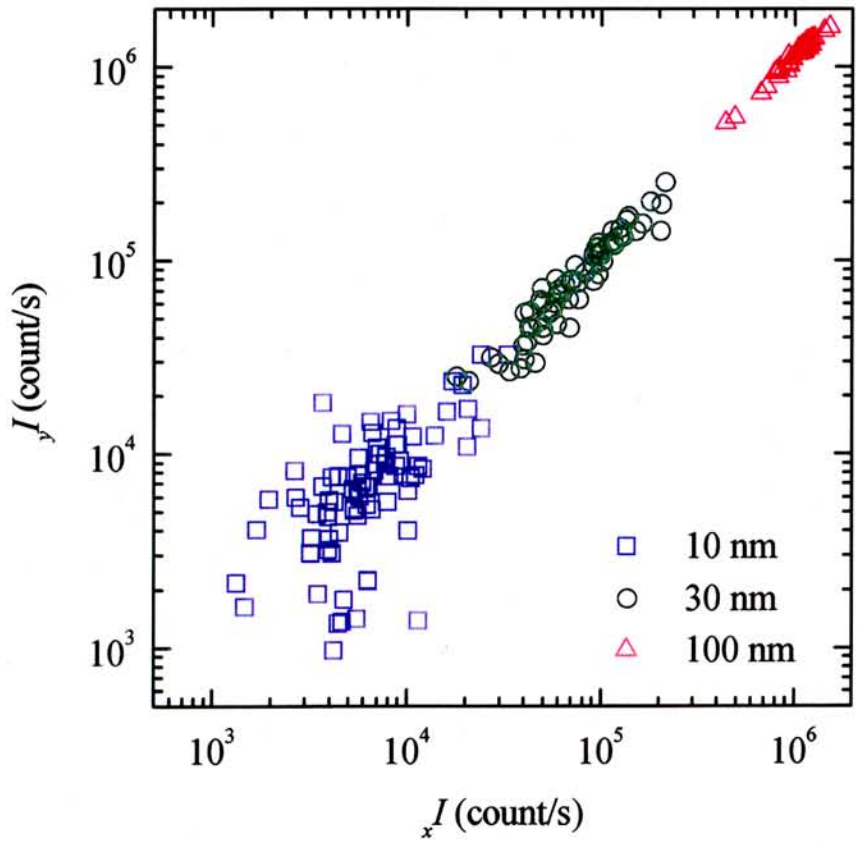


図20　X軸エバネッセント場とY軸エバネッセント場の強度キャリブレーション
X軸エバネッセント場とY軸エバネッセント場で励起したときの蛍光ポリスチレンラテックスビーズが放出する蛍光強度 $_xI$ と $_yI$。二つのエバネッセント場の励起強度が観察面のアバランシェフォトダイオードに対応する点で等しくなるように片方のレーザ強度を調整した。このグラフはレーザ強度調整後、直径 0.1 μm、0.03 μm、0.01 μm の蛍光性ポリスチレンラテックスビーズの蛍光をカウントしたもの。

励起の偏光度は次のような手順で測定した。胴付け面でのレーザ強度が約250 μWの条件でISITによりTRIA標識S1を観察する。モニターしているS1のうちの一つを物体面上のアバランシフォトダイオードに対応する点に移動させる。結像系の光路を切り替えて APD 側に蛍光を導く。顕微鏡ステージを操作してアバランシェフォトダイオードによる蛍光のカウントが最大となる位置にS1を移動させる。NDフィルターを取り去り励起光強度を約1.5 mWにあげる。色素は平均約10秒程度で退色するが、退色後10秒間ほどバックグラウンドの光強度を測定しておく。結像系の光路をISIT側に切り替え、次の色素の偏光度を測定する。

3.3 実験結果

3.3.1 励起偏光度の測定

TRIA-SH1-S1 のイメージ

図23はTRIAでSH1を標識したS1の1ビデオフレーム(1/30秒)像である。この像は照明用エバネッセント場を500 msごとに切り替えて撮影した。X軸エバネッセント場で励起したときとY 軸エバネッセント場で励起したときに観察される蛍光色素の様相が異なっている。図中、上の分子は X 軸エバネッセント場でしか励起されないが、下の分子は両方のエバネッセント場で励起された。励起効率は励起ダイポールと励起電場ベクトルの内積に比例する。上の分子の励起ダイポールはX軸に平行であるが、下の分子のそれは45度の位置にあると考えられる。イメージの大きさは6.4 × 6.4 μm、照明強度は胴付け面で1.5 mW。

実時間偏光度変化

TRIA 1分子の励起偏光度の時間変化を図24と図25に示す。図に示したデータは色素をアバランシェフォトダイオードに対応する位置に移動させ、ND フィルターを取り去って励起レーザの強度を胴付け面で約1.5 mWに増強させた後からのカウントである。図24は色素が退色するまでの間一定の偏光度をとる例(安定型)を示す。図25は退色までの間に偏光度が大きく揺らぐ例(ゆらぎ型)を示す。TRIA-SH1-S1、TRIA-cgmRLC-S1、TRIA-cgmRLC-S1 とアクチンフィラメントを化学架橋したサンプルすべてにおいて安定型とゆらぎ型が観察された。

励起偏光度のヒストグラム

色素のゆらぎの大きさを求めるために、励起偏光度の分布を調べた。すべての測定から安定型を示したTRIAの励起偏光度を取り出し、その分布を調べた(図26)。

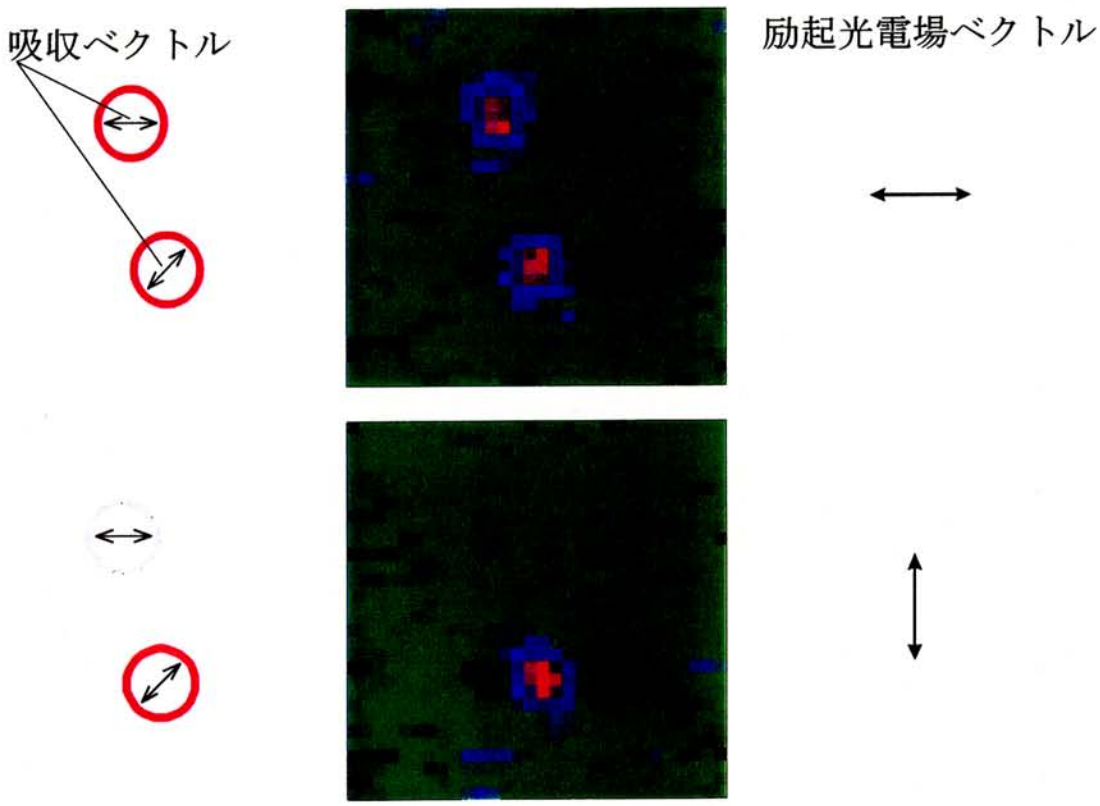


図22　励起偏光度測定顕微鏡による S1 像
SH1 を TRIA で標識した S1 の 1 フレーム画像。図中上の S1 は電場ベクトルが水平方向の時にのみ励起されるが、下の S1 は水平と垂直両方向の電場で励起される。バッファーは 25 mM プロピオン酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、20 mM HEPES, 1%(v/v) 2-メルカプトエタノール、pH 7.8。イメージの大きさは 6.4 × 6.4 μm。励起光強度は対物レンズ胴付け面で約 1.5 mW。

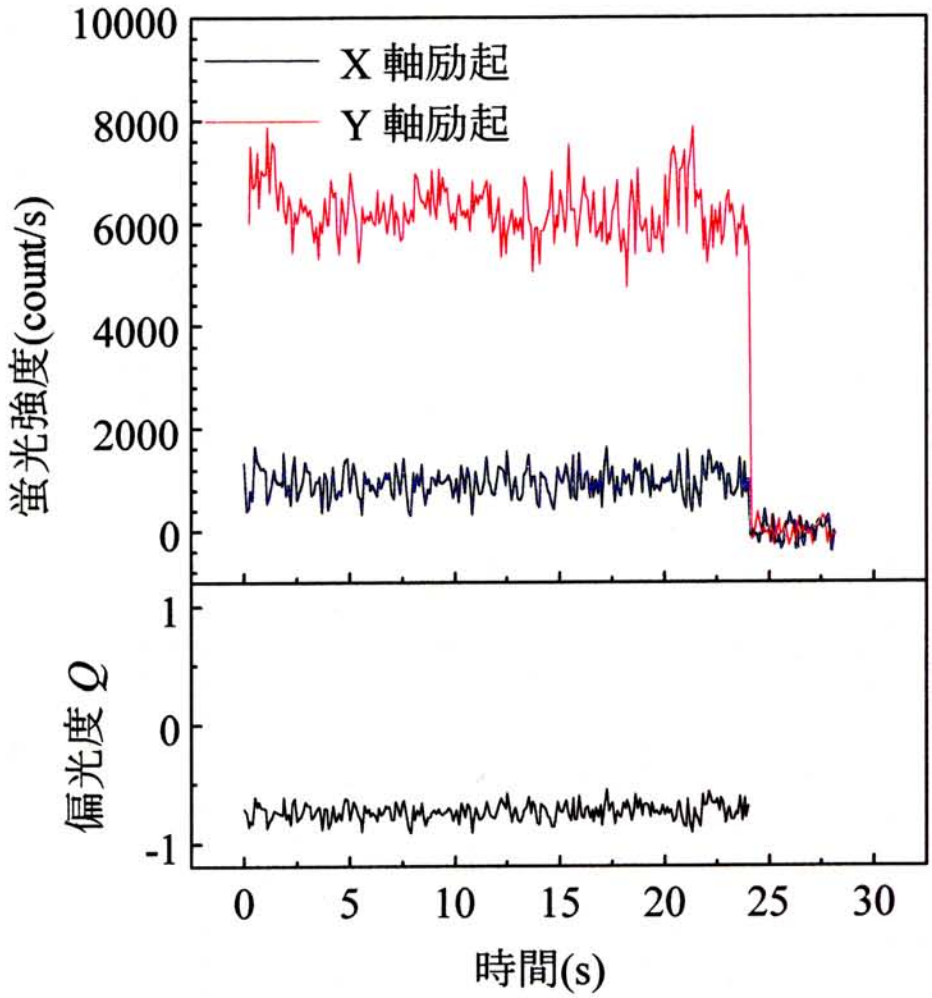


図24　一定の値をとる励起偏光度の例
退色までの間、一定の偏光度をとる(安定型)。 この例のサンプルは TRIA-SH1-S1。カウントのゲートタイムは 50 ms。レーザ強度を増強した時間を 0 秒とした。レーザ強度は X 軸エバネッセント場、Y 軸エバネッセント場ともに胴付け面で約 1.5 mW。蛍光強度は退色後の背景光を引いた蛍光のみの値。

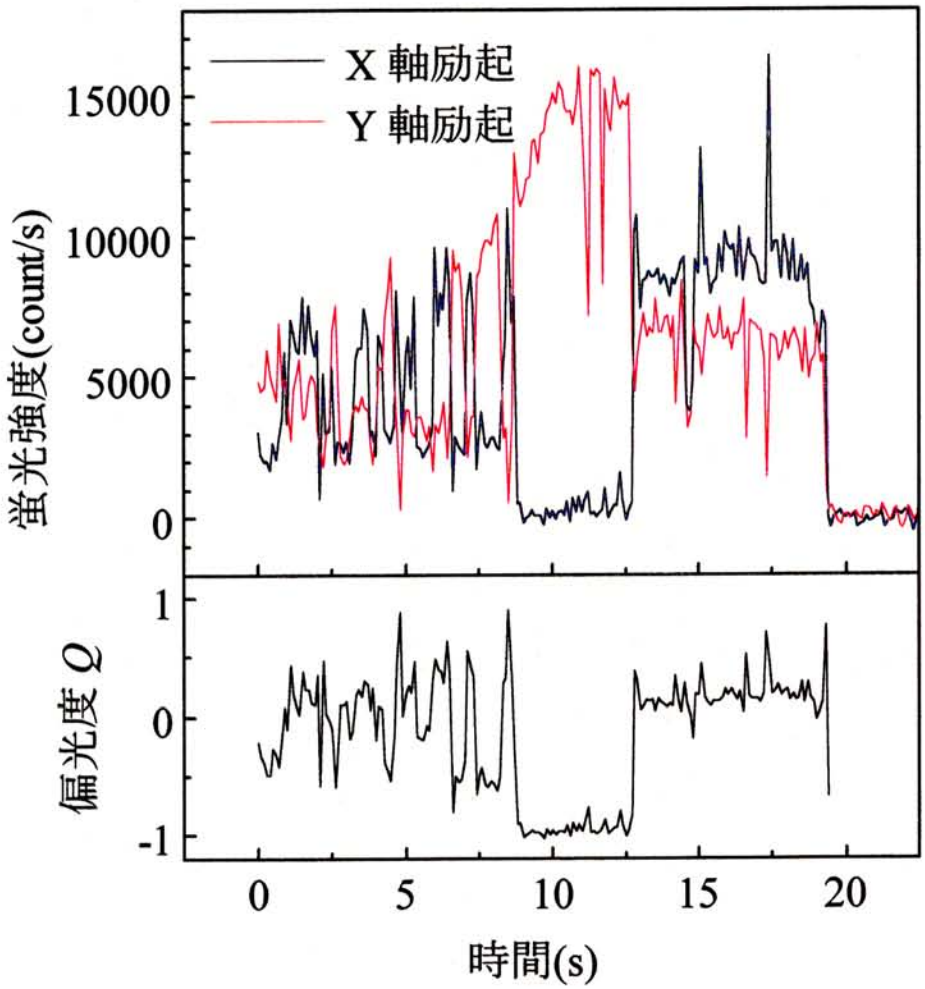


図25 偏光度が揺らぐ例

退色までの偏光度が揺らぐ例(ゆらぎ型)。 この例のサンプルは TRIA-SH1-S1。カウントのゲートタイムは 50 ms。レーザ強度を増強した時間を 0 秒とした。レーザ強度は X 軸エバネッセント場、Y 軸エバネッセント場ともに胴付け面で約 1.5 mW。蛍光強度は退色後の背景光を引いた蛍光のみの値。

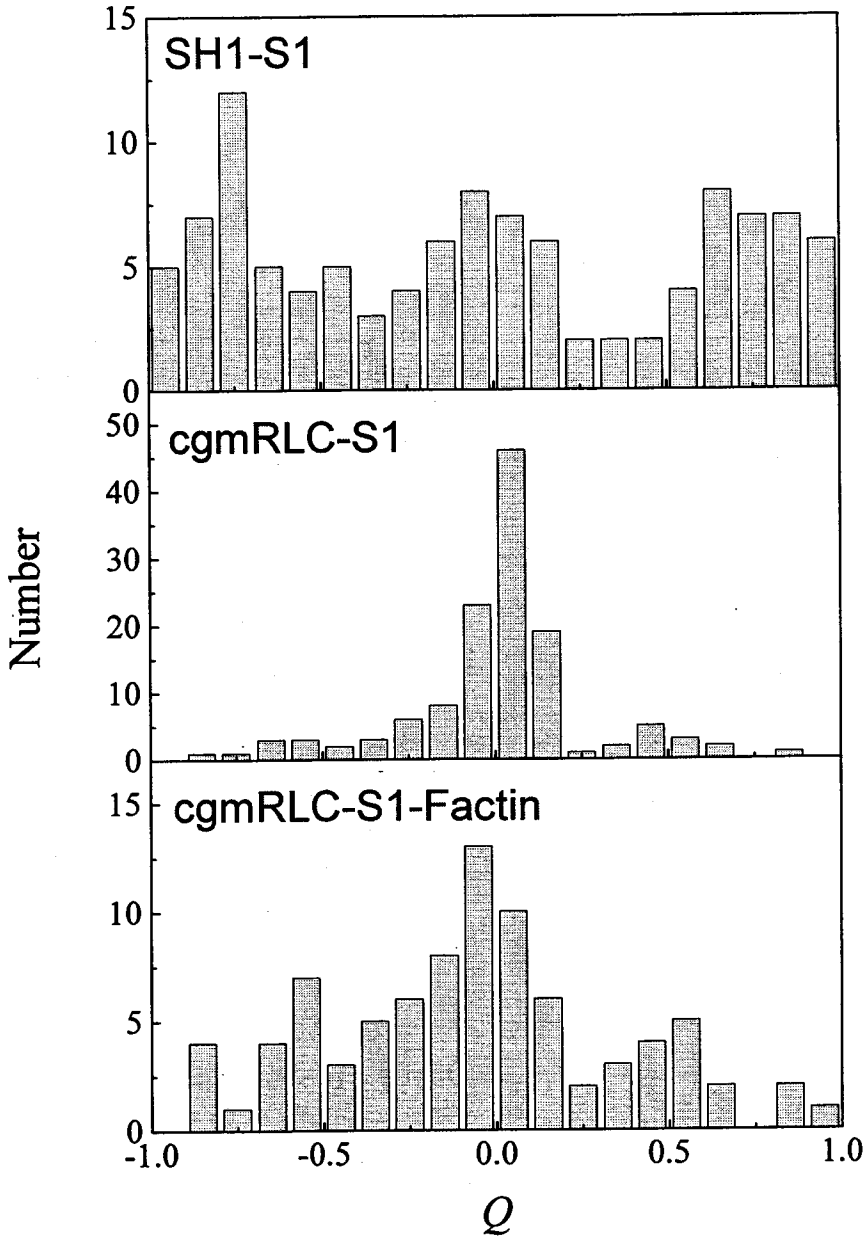


図26 励起偏光度のヒストグラム
安定型の励起偏光度を示すTRIAのみを抽出した。上:SH1標識S1。中央:cgmRLC標識S1。
下:cgmRLC 標識 S1 をアクチンフィラメントと EDC 架橋したもの。

3.4 考察

3.4.1 計測できる偏光度の範囲

ミオシン S1 の SH1 に結合した TRIA の励起偏光度を1分子レベルで測定したところ、励起偏光度は-1 から 1 に分布した(図 26上)。蛍光色素1分子の偏向度を測定する場合には励起の偏向度を測定することにより-1 から 1 の範囲で計測できることが示された。

3.4.2 タンパク質のゆっくりした構造のゆらぎ

色素の回転ブラウン運動はその時定数が 10^{-9} から 10^{-6}s 程度である。今回の励起偏光度測定では励起光を 50 ms ごとに切り替えている。この測定速度は色素の回転ブラウン運動よりも十分に遅い。1 ゲートタイム(50 ms)に測定される励起偏光度の値は 50 ms での平均のダイポールの向きとなる。よって、この測定システムでは偏光解消法のような 10^{-9} 秒オーダーの回転運動は計測できないが、サブ秒から数秒のオーダーの構造変化を計測できる。

1分子偏光度測定法において 0.1 秒から数秒のオーダーの色素のゆらぎが観察された。図 25 に示す偏光度が揺らぐタイプの例では、50 ms よりも長いタイムスケールで偏光度が揺らぐ様子が観察されている。先に述べたように色素の回転ブラウン運動はゲートタイムよりも十分にはやいので、このゆっくりした偏光度のゆらぎは色素の回転ブラウン運動では説明が付かない。このゆらぎはタンパク質の構造のゆらぎを反映していると言える。タンパク構造の何がこの色素ゆらぎに反映されているかを特定することはできない。しかし、タンパク質構造がある特定の構造を持ったまま存在するのではないようだ。構造のポテンシャルには複数の谷が存在しその間をサブ秒から数秒の時間レンジで移動しているようである。

3.4.3 色素のゆらぎモデル

実際の蛍光色素はカバーガラス上に完全に固定されているわけではなく、ブラウン運動により激しく振動している。本研究の測定ではそのブラウン運動の平均を測定している。ここで、色素が揺らいでいるときの偏光度の値を計算し、ブラウン運動の大きさを見積もってみる。

吸収ベクトルが光軸を中心に回転しているとする。実際には角 ϕ と θ の両方向に振動しているが、ここでは簡単のために1自由度にのみ振動しているとし、角 ϕ で振動、角 θ は固定と考える。動かない蛍光色素の励起の偏光度 Q は

$$Q = -\cos 2\phi$$

であった。いま、角 ϕ_c を中心に $\pm\delta$ だけ振動しているとする。存在の確率密度は振動範囲中で等しいとする。観測される平均の偏光度 Q_m は、

$$Q_m(\phi_c,\delta)=\frac{1}{2\delta}\int_{\delta}^{+\delta}-\cos 2(\phi_c+\phi)d\phi$$
$$=-\frac{1}{2\delta}\sin 2\delta\cos 2\phi_c$$

となる。振動が大きくなると偏光度 Q_m の絶対値が小さくなる。ϕ_c=0°、90°、の時、

$$Q_m(0°,\delta)=+\frac{1}{2\delta}\sin 2\delta$$
$$Q_m(90°,\delta)=-\frac{1}{2\delta}\sin 2\delta$$

となる。この値は実際に得られたヒストグラム分布の上限と下限を与える。ヒストグラムの分布範囲から蛍光色素ダイポールの移動度 δ を計算できる。δ が小さいときは偏向度 Q の分布が広がる。Q が-1 または 1 に近い範囲では $\frac{dQ}{d\phi}$ が小さいので $Q_m(0°,\delta)$ と $Q_m(90°,\delta)$ を見積もることが難しい。そこで、偏向度分布を見かけの角度 ϕ_m の分布に変換し、その分布の上限と下限 ϕ_m^{max}, ϕ_m^{min} から

$$-\cos 2\phi_m^{\min}=+\frac{1}{2\delta}\sin 2\delta$$
$$-\cos 2\phi_m^{\max}=-\frac{1}{2\delta}\sin 2\delta$$

の関係より δ を求める。

3.4.4 TRIA の移動度

測定した TRIA-SH1-S1 の偏向度分布からその移動度を計算した。TRIA-SH1-S1 において安定型を示した TRIA の励起偏光度のヒストグラム分布は-1 から 1 間での分布を示した。図 27 は偏向度ヒストグラムを $Q=\cos 2\phi$ の変換式により角度になおした時の角度分布を示す。図中の矢印を角度分布の上限と下限の値、10°と 80°として ϕ_m^{max}、ϕ_m^{min}、δ の関係式から色素の移動度を計算してみると δ= 17°となる。

TRIA-cgmRLC-S1 での TRIA の移動度を図 26中段のヒストグラムから計算した。ヒストグラム分布の上限と下限を 0.1 と-0.1 とし、前項の $Q_m(0°,\delta)$と $Q_m(90°,\delta)$から計算すると約 80°となる。cgmRLC に結合した TRIA は SH1 に結合した TRIA に比べて激しく振動していることを示している。

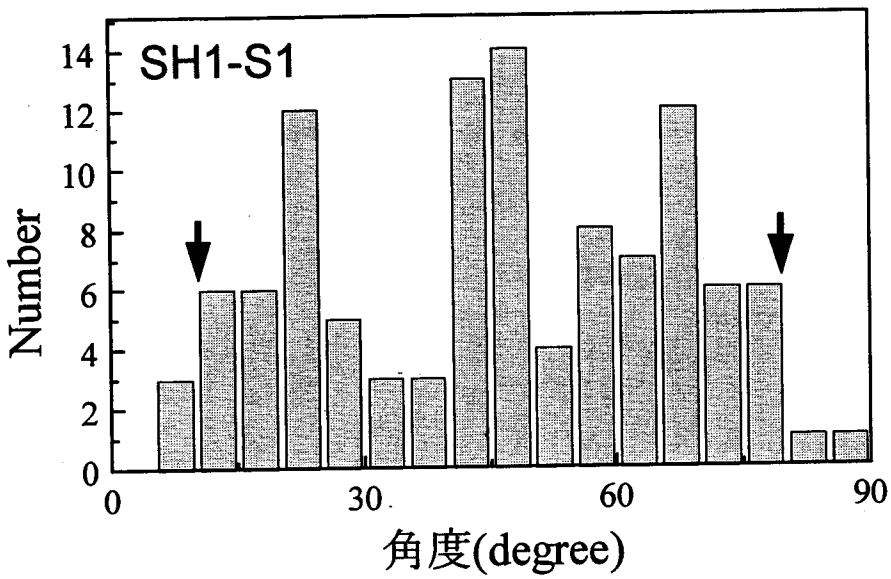


図27 SH1 に結合した TRIA の計算された角度分布
図 26上のヒストグラム分布を角度に変換し再プロットしたもの。矢印の値を角度分布の最大と最小として色素ダイポールの移動度を計算する。

この振動は色素の振動を示していてS1の振動を直接示しているわけではない。この色素の振動の原因として二つのことが考えられる。タンパク質の構造は堅いがタンパク質に対する色素の結合が弱いので色素が揺らいで観察される場合と、色素はタンパク質に堅く結合しているがタンパク質の構造が揺らいでいる場合である。本測定ではこの二つの違いを識別できない。タンパク質の構造変化を測定するためにはタンパク質に堅く結合する色素を選択する必要がある。

3.4.5 アクチンフィラメントの影響

cgmRLC にTRIAを結合させたS1をアクチンフィラメントにEDC架橋したサンプルでTRIAの偏光度分布を測定するとその分布範囲はS1単独で測定した時の偏向度分布よりも広い範囲に分布した。もし、タンパク質の構造変化はないがcgmRLCに対するTRIAの結合が弱いのでTRIAの移動度が大きいとしたら、たとえS1がアクチンフィラメントに架橋してもTRIAの移動度に変化はないはずである。しかし、アクチンと架橋したときのcgmRLCに結合したTRIAの偏向度分布はS1単独で測定したときの偏向度分布よりも広い分布となった。このことは、TRIAは一点をcgmRLCに固定されているが完全に自由に振動しているわけではなく、ある程度S1のcgmRLC部分から影響を受けて、さらに、アクチンフィラメントの結合はS1の構造のゆらぎに影響を与えることを示している。

3.4.6 発展

測定の時間分解能を数 ms 程度にまで上げてより時間分解能の良い測定をすることも可能である。今回の測定ではゲート時間を 50 ms に設定した。物体面上での照明領域が 50 μm × 70 μm で、対物レンズ胴付け面でのレーザ強度が約 1.5 mW のときに、TRIA の退色時間は約 10 秒であった。このときアバランシェフォトダイオードで検出される光子は平均 ~10,000 count/s であった。レーザの励起強度を上げることにより蛍光色素から単位時間あたりに放出されるフォトンの数を増加させることができる。その結果アバランシェフォトダイオードのゲート時間を短くできるので偏光度測定の時間分解能を向上させることができる。ただし、レーザ強度を上げると退色までの時間が短くなる。

本測定によって蛍光色素1分子の偏向度を測定できることが示された。今回の測定ではタンパク質1分子の能動的な構造変化を直接測定できた訳ではないが、S1 の構造のゆらぎを1分子レベルで直接観察することができた。また、S1 以外のタンパク質でも1分子偏光測定は可能である。

本測定では S1 1分子レベルでそれに結合した色素の移動度を見積もることができた。筋原線維などで色素が円筒状対称に結合しているモデルでは、結合色素の移動度を蛍光色素平均の偏光度から見積もることができたが(Irving, 1996)、本測定により1分子レベルでも色素の移動度を測定することができた。タンパク質が円筒状に対称である必要はなくランダムに分布していても良いので S1 以外のタンパク質に結合した色素の移動度を測定できる。

本当に測定したい物理量は色素のゆらぎではなくタンパク質の構造変化であるので、蛍光色素がタンパク質に堅く結合していることは重要である。Corrir らは蛍光色素をタンパク質に堅く結合させるため、蛍光色素ローダミンに二つのシステイン反応基を導入した(1997)。この色素を用いて Ferguson らと Sabido-David らは遺伝子工学的手法により二つのシステイン残基を導入したミオシン軽鎖を合成し色素を堅く結合させている(1997)。この方法は他のタンパク質にも応用できる有効な方法である。

4 結論

本研究では対物レンズ型エバネッセント場照明による蛍光色素1分子水中実時間観察とアンチストークス蛍光観察を使った2波長同時観察法、蛍光色素1分子偏光測定法を開発した。これらの新技術を使って Cy3-ATP アナログによる筋収縮タンパク質ミオシンによる1分子酵素反応とそれに共役する力学反応の同時可視化を実現した。さらに、蛍光色素1分子の偏光状態からタンパク質分子の構造変化を直接計測することができた。

本研究で達成された対物レンズ型エバネッセント場照明は今後様々なタンパク質研究の分野で使用されるであろう。1995 年に Funatsu らが水溶液中で蛍光色素1分子の実時間イメージングを成功させてから、蛍光色素1分子観察に関係する研究が数多く発表されている。それは、1995 年以前にも1分子レベルでの研究が求められていたからである。対物レンズ型エバネッセント場照明法は高い蛍光シグナルと背景光の比を保ったまま蛍光色素1分子を観察する簡便な方法を提供している。この方法が、今まで適用されていなかった様々なタンパク質に応用されていくだろう。

このエバネッセント場照明と蛍光性 ATP アナログ、Cy3-ATP、を使うことにより ATP 加水分解反応を1分子レベルで可視化することができる。ATP や GTP の関係する酵素分子反応はたくさんある。蛍光性のヌクレオチドアナログと蛋白質の同時可視は、1分子酵素反応とそれに共役して起こる様々な反応の同時可視化を可能にする。この同時可視化は分子メカニズムを解明する有効な手段となるだろう。

対物レンズ型エバネッセント場照明は近年急速に開発が進んでいる AFM を初めとするスキャニング型の顕微鏡を組み合わせることが容易である。スキャニング型顕微鏡の欠点として観察範囲の狭さが上げられるが、蛍光顕微鏡と組み合わせることにより蛍光標識したタンパク質分子の位置を確認しその場所をスキャンすることも可能になる。最近、従来の AFM で使用されていたカンチレバーよりも一桁程度柔らかいカンチレバーと光の輻射圧を用いたフィードバック制御を組み合わせて、サブピコニュートン、サブナノメートルの分解能を持つ分子間力顕微鏡が開発された(Tokunaga *et al.*, 1997)。対物レンズ型エバネッセント場照明を使用した1分子計測として、対物レンズ型エバネッセント場照明顕微鏡でミオシン S1 1分子を観察しながら微小ガラス針の先端に S1 1分子を捕捉し、アクチンフィラメントとの間に発生する力を計測した例が報告されている。(Kitamura *et al.*, 1997)。これら1分子可視化、1分子捕捉、サブピコニュートン-サブナノメートル測定の技術を組み合わせることによりタンパク質分子間の相互作用を詳細に調べることが可能になる。

本研究で有効性を示したアンチストークス蛍光観察法は、二重標識された生体試料の観察に広く使用されていくものと思われる。この観察法は従来まったく使用されていなかった観察方法であるが、励起光にレーザを使用することで簡単に実現できる。また、この観察方法を使うこ

とにより二重標識試料の同時観察のための光学系がシンプルなものになる。この観察方法は三重標識、四重標識サンプルを同時観察する可能性を秘めていので、多数の構成要素を含む細胞の観察には有効な方法となるであろう。例えば、細胞中の DNA、マイクロチューブル、キネシンを三つの蛍光色素で染め分け、そのダイナミクスを同時に可視化することができる。このような多重標識サンプルの同時観察は1分子レベルの現象のみならず細胞レベルでの現象の解明にも応用できるであろう。

今回開発した1分子励起偏光測定法により、タンパク質の構造変化を実時間で時間分解能良く計測することが可能になった。タンパク質の機能を大きく損なうことなく1分子レベルでの測定が可能な方法は蛍光プローブを使用する方法しかない。今回開発した方法は他のタンパク質分子にも応用可能な方法である。タンパク質の機能が構造変化と密接に関係している例はモータータンパク質だけではない。ミトコンドリア中に存在するエネルギー変換酵素 F1FoATPase は水素イオン濃度勾配を利用して ADP とリン酸から ATP を合成する。その合成過程または逆反応において、酵素の中心にあるサブユニットが回転していることが突き止められた(Noji, *et al.*, 1997)。このタンパク質のように、ATP 加水分解反応と構造変化が共役しているものもある。タンパク質の構造変化を偏光度測定から測定し、同時に蛍光性 ATP アナログ Cy3-ATP 1分子の ATP 加水分解反応を可視化すれば、1分子化学反応とそれに伴う構造変化を同時に検出することも可能である。このような方法によりタンパク質のエネルギー変換機能の本質に迫ることが可能になる。

以上、本研究で開発した対物レンズ型エバネッセント場照明による蛍光色素1分子水中実時間観察法とアンチストークス蛍光観察を使った2波長同時観察法、蛍光色素1分子偏光測定法はそれ単独で使用してもタンパク質研究の有効な手段となるが、それらを組み合わせることによってさらに多くの情報をタンパク質分子から引き出す手段となるであろう。

謝辞

本研究をおこなうにあたりご指導下さいました柳田敏雄教授に深く感謝いたします。

数多のご指導とご助言を下さいました共同研究者である科学技術振興事業団柳田生体運動子プロジェクトの徳永万喜洋博士に深く感謝いたします。私が大阪大学基礎工学研究科に入学したときから、永きに渡りご指導とご助言を下さいました同プロジェクト原田慶恵博士に深く感謝いたします。顕微鏡及び1分子観察に関し貴重なご指導をして下さいました同プロジェクトの船津高志博士に深く感謝いたします。BDTC-cgmRLC と cgmRLC を作成してくださった大阪大学基礎工学部生物物理研究室の岩根敦子助手に深く感謝いたします。

本論文の副査をしていただいた大阪大学基礎工学部の葛西道生教授と佐藤俊輔教授に深く感謝いたします。

同プロジェクトの皆様方と大阪大学基礎工学部生物物理研究室の皆様には常日頃から貴重な時間を割いてディスカッションしていただき、また、数多くの援助をしていただきました。皆様に心から感謝の意を表します。

文献

Axelrod, D. (1979) Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization.*Biophys, J.* **26**. 557-573.

Axelrod, D. (1990) Total Internal Reflection Fluorescence at Biological Surfaces. *Noninvasive Techniques in Cell Biology*. (ed. by J. K. Foskett & S. Grinstein), pp. 93-127., Wiley-Liss, New York.

Bensimon, D., Simon, A. J., Croquette, V. & Bensimon, A. (1995) Stretching DNA with a receding meniscus: experiments and models. *Phys. Rev. Letts*. **74**. 4754-4757.

Betzig, E. & Chichester, R. J. (1993) Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science*. **262**. 1422- 1425.

Corrie, J. E. T., Brandmeier, B. D., Craik, J. S., Munsainghe, V. R. N., Howwell, S., Trentham, D. R. & Kendrick-Jones, J. (1997) A new bifunctional rhodamine to label mutant regulatory light chains of gizzard myosin. *Biophys. J.* **72**. A52.

Cremo, C. R., Neuron, J. M. & Yount, R. G. (1990) Interaction of myosin subfragment 1 with fluorescent ribose-modified nucleotides. A comparison of vanadate trapping and SH1-SH2 cross-linking. *Biochemistry*. **29**. 3309-3319.

Ferguson, R. E., Martin, S. R., Brandmeier, B. D., Kendrick-Jones, J., Hodges, R. S., Skyes, B. D., Corrie, J. E. T., Irving, M. & Trentham, D. R. (1997) Bifunctional rhodamine-labeled regulatory light chains bind to myosin heavy chains and provide a framework of dipole orientations in fibers. *Biophys. J.* **72**. A52.

Finer, J. T., Simmons, R. M. & Spudich, J. A. (1944) Single myosin molecule mechanics: piconewton force and nanometre steps. *Nature*. **368**, 113- 119.

Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K. & Yanagida., T. (1995) Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature*. **374,** 555- 558.

Harada, Y. & Yanagida, T. (1988) Direct observation of molecular motility by light microscopy. *Cell Motil. Cytoskel.* **10,** 71-76.

Harada, Y., Noguchi, A., Kishino, A. & Yanagida. T. (1987) Sliding movement of single actin filaments on one-headed myosin filaments. *Nature*. **326**. 805-808.

Harada, Y., Sakurada, K., Aoki, T., Thomas, D. D. & Yanagida. T. (1990) Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by *in vitro* movement assay. *J. Mol. Biol.* **216**. 49-68.

Houseal, T. W., Bustamante, C., Stump, R. F., & Maestre, M. F. (1989) Real-time imaging of single DNA molecules with fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **56**. 507-516.

Irving, M. (1996) Steady-state polarization from cylindrical symmetric fluorophores undergoing rapid restricted motion. *Biophys. J.* **70**. 1830-1835.

Ishijima, A. Harada, Y. Kojima, H. Funatsu, T. Higuchi, H & Yanagida, T. (1994) Single-molecule analysis of the actomyosin motor using nano-manipulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**. 1057-1063.

Ishijima, A., Doi, T., Sakurada, K. & Yanagida, T. (1991) Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin *in vitro*. *Nature.* **352**. 301-306.

Iwane H. A., Kitamura, K., Tokunaga, M. & Yanagida, T. (1996) Myosin subfragment-1 is fully equipped with factors essential for motor function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**. 76-78.

Kabata, H., Kurosawa, O., Arai, I., Washizu, M., Margarson, S. A., Glass, R. E. & Shimamoto, N. (1993) Visualization of single molecules of RNA polymerase sliding along DNA. *Science*. **262**. 1561-1563.

Kishino, A. & Yanagida. T. (1988) Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature*. **334**. 74-76.

Kitamura, K., Tokunaga, M., Iwane, A., Saito, K. & Yanagida, T. (1997) Manipulation and nanometer measurement of a single motor protein molecule captured directly by a scanning probe. *Biophys. J.* **72**. A55.

Kron, S. J. & Spudich, J. A. (1986) Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**. 6272-6276.

Margossian, S. S., Stafford, W. F. 3rd, & Lowey, S. (1981) Homogeneity of myosin subfragments by equilibrium centrifugation. *Biochemistry*. **20**. 2151-21555.

Messer, N. G. & Kendrick-Jones, J. (1988) Molecular cloning and sequencing of the chicken smooth muscle myosin regulatory light chain. *FEBS Lett*. **234**. 49-52.

Molloy, J. E., Burns, J. E., Kendrick-Jones, J., Tregear, R. T. & White, D. C. S . (1995) Movement and force produced by a single myosin head. *Nature*. **378**. 209-212.

Morikawa, K & Yanagida, M. (1981) Visualization of individual DNA molecules in solution by light microscopy: DAPI staining method. *J. Biochem*. **89**. 693-696.

Nagashima, H. (1986) Active movement of synthetic myosin filaments observed by dark-field light microscopy. *J. Biochem.* **100**. 1023-1029.

Nie, S., Chiu, D. T. & Zare, R. N. (1994) Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy. *Science*. **266**. 1018-1021.

Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinosita, K. Jr. (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*. **386**. 299-302.

Perkins, T. T., Quake, S. R., Smith, D. E. & Chu, S. (1994) Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy. *Science*. **264**. 822-826.

Rajasekharan, K. N., Morita, J., Mayadevi, M., Ikebe, M. & Burke, M. (1991) Formation and properties of smooth muscle myosin 20-kDa light chain-skeletal muscle myosin hybrids and photocrosslinking from the maleimidylbenzophenone-labeled light chain to the heavy chain. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**. 584-590.

Sabido-David, C., Ferguson, R. E., Brandmeier, B. D., Hopkins, S. C., Goldman, Y. E., Kendrick-Jones, J., Dale, R. E., Corrie, J. E. T., Trentham, D. R. & Irving, M. (1997) Orientation of bifunctional rhodamine probes on myosin regulatory light chain (RLC) in relaxed, contracting and rigor muscle. *Biophys. J.* **72**. A52.

Saito, K., Aoki, T., Aoki, T. & Yanagida, T. (1994) Movement of single myosin filaments and myosin step size on an actin filament suspended in solution by a laser trap. *J. Biophys.* **66**. 769-777.

Sase, I., Miyata, H., Corrie, J. E. Craik, J. S. & Kinosita, K. Jr. (1995) Real time imaging of single fluorophores on moving actin with an epifluorescence microscope. *Biophys. J.* **69**. 323-328.

Schafer, D. A., Gelles, J., Sheetz, M. P. & Landick, R. (1991) Transcription by single molecules of RNA polymerase observed by light microscopy. *Nature*. **352**. 444-448.

Smith, S. B., Aldridge, P. K., & Callis, J. B. (1989) Observation of individual DNA molecules undergoing gel electrophoresis. *Science*. **243**. 203-206.

Sowerby, A. J., Seehra, C. K., Lee, M. & Bagshaw, C. R. (1993) Turnover of fluorescent nucleoside triphosphates by isolated immobilized myosin filaments. Transient kinetics on the zeptomole scale. *J. Mol. Biol.* **234**. 114-123.

Spudich, J. A. & Watt. S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **246**. 4866-4871.

Sutoh, K., (1983) Mapping of actin binding sites on the heavy chain of myosin subfragment 1. *Biochemistry*. **22**. 1759-1585.

Szent-Györgyi, A. (1951) *Chemistry of Muscular Contraction*, 2nd Ed., Academic Press, New York.

Tokunaga, M., Aoki, T., Hiroshima, M., Kitamura, K. & Yanagida, T. (1997) Subpiconewton intermolecular force microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**. 566-569.

Tokunaga, M., Kitamura, K., Saito, K., Iwane, A. H. & Yanagida, T. Single molecular imaging of fluorophores and enzymatic reactions simply achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. (to be submitted to *Biochem. Biophys. Res. Commun.*).

Trautman, J. K., Macklin, J. J. & Betzig, E. (1994) Near-field spectroscopy of single molecules at room temperature. *Nature*. **369**. 40- 42.

Trybys, K. M. & Chatman, T. A. (1993) Chimeric regulatory light chains as probes of smooth muscle myosin function. *J. Biol. Chem.* **268**. 4412-4419.

Vale, R. D., Funatsu, T., Pierce, D. W., Romberg, L., Harada, Y. & Yanagida, T. (1996) Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature*. **380**. 450-453.

Yanagida, M., Hiraoka, Y. & Katsura, I. (1983) Dynamic behaviors of DNA molecules in solution studied by fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **47**. Pt 1: 177-87.

Yanagida, T., Arata, T. & Oosawa, F. (1985) Sliding distance of actin filament induced by a myosin crossbridge during one ATP hydrolysis cycle. *Nature*. **316**. 366-369.

Yanagida, T., Nakase, M, Nishiyama, K. & Oosawa, F. (1984) Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. *Nature*. **307**. 58- 60.

Yin, H., Landick, R. & Gelles, J. (1994) Tethered particle motion method for studying transcript elongation by a single RNA polymerase molecule. *Biophys. J.* **67**. 2468-2478.

Yin, H., Wang, M. D., Svoboda, K., Landick, R., Block, S. M. & Gelles, J. (1995). Transcription against an applied force. *Science*. **270**. 1653-1657.

木下一彦 & 御橋廣眞、1983、蛍光測定、学会出版センター

和沢鉄一、1997、博士論文、大阪大学

参考文献

Yanagida, T., Ishijima, A., **Saito, K.** & Harada, Y. (1993) Coupling between ATPase and force-generation attachment-detachment cycles of actomyosin in vitro. *Mechanism of Myofilament Sliding in Muscle Contraction* (ed. by H. Sugi and G. H. Pollack), pp. 339-47. Plenum Press, New York

Saito, K., Aoki, T., Aoki, T. & Yanagida, T. (1994) Movement of Single Myosin Filaments and Myosin Step Size on an Actin Filament Suspended in Solution by a Laser Trap. *Biophys. J.* **66**. 769-777.

Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., **Saito, K.** & Yanagida, T. (1995) Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature*, **374**. 555-559.

Yanagida. T., Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., **Saito, K.**, Higuchi, H. & Ishii, Y. Single molecule imaging and nano-manipulation of biomolecules. *Methods in Cell Biology* Academic Press. (in press)

Funatsu, T., Harada, Y., Higuchi, H., Tokunaga, M., **Saito, K.**, Ishii, Y., Vale, R., D. & Yanagida, T. Imaging and nano-manipulation of single biomolecules. *Biophis. Chem.* (in press)

図版目録

図 1 エバネッセント場照明の模式図 11
図 2 エバネッセント場強度の深さ依存性 12
図 3 プリズム型エバネッセント場照明 15
図 4 対物レンズ型エバネッセント場照明 16
図 5 蛍光性 ATP アナログ Cy3-ATP 21
図 6 1分子観察のための対物レンズ型エバネッセント場照明顕微鏡の概略図 24
図 7 蛍光色素 BODIPY FL と TRIA の蛍光スペクトルとダイクロイックミラーの透過率 25
図 8 蛍光色素1分子の蛍光強度定量 29
図 9 Cy3-BDTC-S1 の蛍光像と蛍光強度時間変化 30
図 10 Cy3-BDTC-S1 の蛍光強度と蛍光寿命 31
図 11 EDC 架橋した TRIA-S1 と BODIPY FL アクチンフィラメントの蛍光像 35
図 12 BODIPY FL 染色アクチンフィラメントと TRIA-S1 の同時観察 36
図 13 Cy3-ATP を用いた BODIPY FL 染色アクチンフィラメントのモーティリティ 40
図 14 対物レンズによる屈折 47
図 15 蛍光色素の吸収ダイポールと放出ダイポール 47
図 16 観察される蛍光強度の係数 49
図 17 二つのエバネッセント場による蛍光色素の励起 51
図 18 蛍光放出の偏光度 52
図 19 吸収の偏光度 52
図 20 1分子励起偏光顕微鏡 55
図 21 偏光度の計算方法 57
図 22 X 軸エバネッセント場と Y 軸エバネッセント場の強度キャリブレーション 58
図 23 励起偏光度測定顕微鏡による S1 像 60
図 24 一定の値をとる励起偏光度の例 61
図 25 偏光度が揺らぐ例 62
図 26 励起偏光度のヒストグラム 63
図 27 SH1 に結合した TRIA の計算された角度分布 66

表目次

表 1　二重標識サンプル観察用のダイクロイックミラーとバンドパスフィルターの組合わせ 26
表 2　検出される蛍光フォトンの照明方法による違い 32

エバネッセント場照明による1分子偏光測定

Polarization measurement of single fluorophores with evanescent field

1997年4月15日　初版発行

著　者　　齋藤　究　（さいとう　きわむ）

発行者　　齋藤　究

発行所　　科学技術振興事業団　柳田生体運動子プロジェクト

〒562　大阪府箕面市船場東 2-4-14

電話　(0727)28-7003　　FAX (0727)28-7033