

Title	表面プラズモン共鳴法と蛍光エネルギー移動法を用いたタンパク質動態の1分子イメージング
Author(s)	横田, 浩章
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3144088
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

表面プラズモン共鳴法と蛍光エネルギー移動法を用いた
タンパク質動態の1分子イメージング

博士論文

1998年1月

大阪大学大学院 基礎工学研究科
物理系専攻 生物工学分野
生物物理研究室

横田浩章

①

目次

謝辞

表面プラズモン共鳴法と蛍光エネルギー移動法を用いた タンパク質動態の1分子イメージング

2. 表面プラズモン共鳴法によるタンパク質1分子の

イメージング

博士論文

1998年1月

2.1 表面プラズモン共鳴法

2.2 表面プラズモン共鳴法を用いたタンパク質1分子の

イメージング

2.3 結果

2.4 結論

2.5 参考文献

2.6 謝辞

2.7 謝辞

2.8 謝辞

2.9 謝辞

2.10 謝辞

2.11 謝辞

2.12 謝辞

2.13 謝辞

2.14 謝辞

大阪大学大学院 基礎工学研究科
物理系専攻 生物工学分野
生物物理研究室

横田浩章

目次

略語一覧	4
1.研究の背景及び目的	6
2.表面プラズモン共鳴によるタンパク質 1 分子の イメージング	12
2.1 目的	13
2.2 全反射 (TIR) と表面プラズモン共鳴 (SPR)	14
2.2.1 全反射 (TIR)	14
2.2.2 表面プラズモン共鳴 (SPR)	19
2.3 光学系	33
2.4 材料	34
2.5 結果	38
2.5.1 反射率曲線	38
2.5.2 表面プラズモン共鳴によるタンパク質 1 分子のイメージング	38
2.5.3 金属表面上でのタンパク質の活性	40
2.5.4 表面プラズモン共鳴によるエバネッセント場の増強	41
2.6 考察	42
2.6.1 金属薄膜の形態の影響	42
2.6.2 金属表面での蛍光分子 1 分子の観察：蛍光消光の影響	43
2.6.3 金属表面上でのタンパク質の活性	44
2.6.4 表面プラズモン共鳴によるエバネッセント場の増強	44
2.7 結論	49
3.1 分子蛍光エネルギー移動法によるアクチン 1 分子の 構造変化実時間イメージング	64

3.1 目的	65
3.2 蛍光励起エネルギー移動 (FRET)	66
3.3 光学系	71
3.4 材料	72
3.5 結果	73
3.5.1 TMRCD, Cy5 二重蛍光標識アクチン 1 分子の分光スペクトル	73
3.5.2 TMRCD, Cy5 二重蛍光標識アクチン 1 分子の 実時間 1 分子 FRET イメージング	74
3.5.3 1 分子 FRET を用いた蛍光色素間の距離の導出方法	74
3.5.4 TMRCD, Cy5 二重蛍光標識アクチン 1 分子の FRET 効率のゆらぎ	74
3.5.5 TMRCD-アクチン、Cy5-アクチン 1 分子の偏光実時間イメージング	75
3.6 考察	75
3.6.1 FRET 効率の理論式 (Förster の式) を、1 分子 FRET に 適用する場合の問題点	75
3.6.2 アクチンの構造	77
3.7 結論	80
4.総括	90
謝辞	92
参考文献	93

略語一覽

ATP	: Adenosine 5'-triphosphate
BF	: Band pass filter
BSA	: Bovine serum albumin
CCD	: Charge coupled device
DM	: Dichroic mirror
DMSO	: Dimethylsulfoxide
DTT:	: Dithioreitol
EDTA	: Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EGTA	: O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FCR	: Fluorescence correlation spectroscopy
FPR	: Fluorescence photobleaching spectroscopy
FRET	: Fluorescence resonance energy transfer
GFP	: Green fluorescent protein
GST	: Glutathione S-transferase
GTP	: Guanosine 5'-triphosphate
HEPES	: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazinyl]ethanesulfonic acid
HMM	: Heavy meromyosin
IICCD	: Image intensified CCD camera
ISIT	: Image intensified SIT camera
MES	: 2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate
NF	: Notch filter
NSOM	: Near field optical microscopy
PB	: Polarized beam splitter
PC	: Personal computer
PEM	: N-[2-(1-piperazinyl)ethyl]maleimide, dihydrochloride
PIPES	: Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
QD	: Quartz diffuser
RCD	: Tetramethylrhodamine cadaverine
S1	: Myosin subfragment-1

SIT	: Silicon-intensifier target tube
SPR	: Surface plasmon resonance
SPRFM	: Surface plasmon resonance fluorescence microscopy
TIR	: Total internal reflection
TIRFM	: Total internal reflection fluorescence microscopy
TMR	: Tetramethylrhodamine
TMRCd	: Tetramethylrhodamine-cadaverine
TnC	: Troponin C
TnI	: Troponin I
VCR	: Video cassette recorder
$\lambda/2$: Half wave plate
λ_{ex}	: wavelength of emission maximum
λ_{ex}	: wavelength of excitation maximum

1. 研究の背景及び目的

溶液中、細胞中や生体分子内部での分子の動態は、最大強度の分子から得られたデータをもとに推察されている。このような実験からは、個々の分子で起こっている事象は多数の分子の平均としてしか把握できず、1分子の特性を明らかにすることは、*物理化学 (Ashwin and Moras, 1991; Bucci and Chabot, 1993; Antonin et al., 1994; Niu et al., 1994; Yonemura et al., 1994; Niu and Duan, 1994; Macklin et al., 1996; Koenig et al., 1997; Lu and Xu, 1997; Sigm et al., 1997; Xu et al., 1997)*、*生物学 (Farrar et al., 1995; Liu et al., 1995; Vais et al., 1995; Deacon et al., 1997; Hasebe, 1997; Ishii et al., 1997; Saito et al., 1997; Yokoyama et al., 1997)* の各分野で、1分子を抽出したり、イメージングしたりする技術が開発されてきている。これらの技術は、一般的に不均一で複雑な生体システムには特に有用である。

活性のある生体分子の動態を観察するためには、まわりの水である環境が欠かせないが、それゆえ、一般に、生体材料を観察するために、光学顕微鏡が使われる。しかしながら、タンパク質、脂質、核酸のような生体分子のサイズ (数 nm 以下) は、光学顕微鏡の分解能より小さいので、1分子の生体分子は直接に観察できない。ここで述べる研究では、1分子のタンパク質分子を蛍光分子で標識することによって、蛍光染料として蛍光化した、1分子の蛍光分子から抽出される光子の数は十分多いので、従来の高感度カメラによって検出できる。1分子蛍光像観察の大きな障害は、水分下からのラマン散乱、溶液中の自己蛍光、入射光の散乱などが原因の大きい背景光である。我々は1分子の蛍光分子の観察を可能にするために、背景光を従来に比べて劇的に減少させることのできる全反射型顕微鏡 (TIRM, 図 1(a)) によって、水溶液中で最大分子1分子が同時に観察できることを示した (Fujimori et al., 1993; Tokunaga et al., 1997)。この方法を用いると、1分子標識反応の直接観察 (Fujimori et al., 1993)、生体分子1分子の動態の観察 (Vais et al., 1996)、タンパク質1分子の構造変化のイメージング (Ishii et al., 1996)、DNAと生体分子1分子の相互作用の観察 (Hasebe, 1997) などが可能である。蛍光光の照射強度を最小限にするNSOM (Ohno and

1. 研究の背景及び目的

固体中、溶液中や生物システム内での分子の挙動は、莫大な数の分子から得られたデータをもとに特徴づけられている。このような実験からは、個々の分子で起こっている事象は多数の分子の平均としてしか類推できず、1分子の特性を引き出すのは難しい。これらの問題点を克服するために、物理、化学 (Ambrose and Moerner, 1991, Betzig and Chichester, 1993, Ambrose *et al.*, 1994, Nie *et al.*, 1994, Trautman *et al.*, 1994, Xie and Dunn, 1994, Macklin *et al.*, 1996, Kneipp *et al.*, 1997, Lu and Xie, 1997, Stipe *et al.*, 1997, Xu *et al.*, 1997)、生物学 (Funatsu *et al.*, 1995, Ha *et al.*, 1996, Vale *et al.*, 1996, Dickson *et al.*, 1997, Harada, 1997, Ishii *et al.*, 1997, Sase *et al.*, 1997, Tokunaga *et al.*, 1997) の各分野で、1分子を検出したり、イメージングしたりする技術が開発されてきている。これらの技術は、一般的に不均一で複雑な生物システムには特に有用である。

活性のある生物分子の挙動を観察するためには、まわりが水である環境が欠かせないが、それゆえ、一般に、生物材料を観察するために、光学顕微鏡が使われる。しかしながら、タンパク質、脂質、核酸のような生物分子のサイズ (数 10nm 以下) は、光学顕微鏡の分解能より小さいので、1分子の生物分子は直接に観察できない。ここで述べる研究では、1分子のタンパク質分子を蛍光分子で標識することによって、蛍光画像として視覚化した。1分子の蛍光分子から放出される光量子の数は十分多いので、従来の高感度カメラによって視覚化できる。1分子蛍光像観察の大きな障害は、水分子からのラマン散乱、溶液の中のゴミの発光、入射光の散乱などが原因の大きい背景光である。我々は、1分子の蛍光分子の観察を可能にするために、背景光を従来に比べて劇的に減少させることのできる全反射型顕微鏡 (TIRFM、図 1(b)) によって、水溶液中で蛍光分子 1分子が実時間で観察できることを示した (Funatsu *et al.*, 1995, Tokunaga *et al.*, 1997)。この方法を用いると、1分子酵素反応の直接観察 (Funatsu *et al.*, 1995)、生体分子 1分子の動きの観察 (Vale *et al.*, 1996)、タンパク質 1分子の構造変化のイメージング (Ishii *et al.*, 1996)、DNA と生体分子 1分子の相互作用の観察 (Harada, 1997) などが可能である。励起光の照射範囲を最小限にする NSOM (Betzig and

Chichester, 1993, Ambrose *et al.*, 1994, Trautnman *et al.*, 1994, Xie, and Dunn, 1994, Ha *et al.*, 1996)、コンフォーカル顕微鏡 (Nie *et al.*, 1994)、2光子励起顕微鏡や、光学フィルターを注意深く選択した落射顕微鏡 (Macklin *et al.*, 1996, Dickson *et al.*, 1997, Lu and Xie, 1997, Sase *et al.*, 1997) も、生体分子 1 分子の観察に有効であると考えられる。

本研究では、この 1 分子蛍光イメージング法を発展させ、タンパク質動態の 1 分子イメージングをすることを目的とした。

この研究の第 1 の目的は、光学顕微鏡法を用いて金属表面の上のタンパク質 1 分子に蛍光標識された蛍光分子の 1 分子をイメージングできる新しい技術を開発することである。

金属表面は、タンパク質や脂質の自己集合 (self-assembly) や自己組織化 (self-organization) が起こる独特の性質を持っている。いくつかの種類自己集合や自己組織化は、金、銀、白金、銅などの金属上と硫黄原子による共有結合によって実現されている (図 21, Bain and Whitesides, 1988, Lang *et al.*, 1994)。金属表面上の秩序だった超分子構造は、細胞の機能である分子認識、信号伝達などの重要な役割を果たしている細胞膜のような 2 次元システムのさらなる理解に欠かせないものである (Müller *et al.*, 1993, Duschl *et al.*, 1994, Sasaki *et al.*, 1997)。

我々は、金属表面の上の蛍光標識されたタンパク質の 1 分子のイメージングに、金属薄膜と溶液の境界の表面プラズモン共鳴 (Raether, 1988) によって発生させたエバネッセント光を用いた (SPRFM, 図 1(c))。エバネッセント場は、溶液中で 100 ~ 200nm のしみだし深さであり、金属表面の近くに局在している。さらに、表面プラズモンによって生じた電磁場は、その伝搬長が、金属なしの場合の全反射型のエバネッセント場よりも一般的に長いという特徴もある。

この研究の第 2 の目的は、蛍光 1 分子イメージング技術をもとに、タンパク質 1 分子内の構造の変化を実時間で直接観察することである。

この目的を達成するために、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) という現象

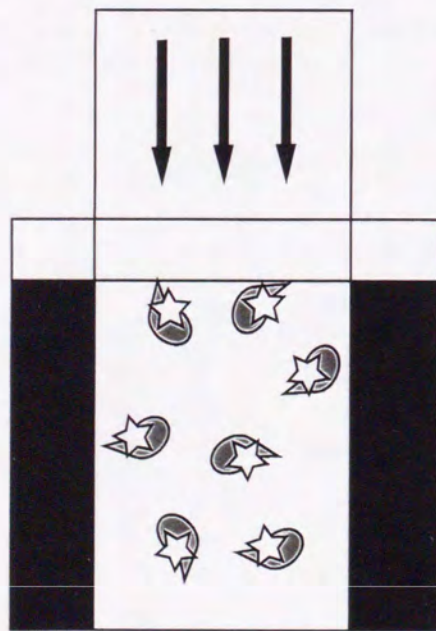
(Förster, 1948) を利用した。この現象は、蛍光分子 (ドナー) の励起エネルギーがすべて蛍光として放出されずに、近くにいる別の蛍光分子 (アクセプター) を励起しアクセプターも蛍光を発するという現象である (図 22)。ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルに重なりがある場合に起こる (図 23)。エネルギー移動効率は、2 つの蛍光色素の相対的な位置に敏感であるので、ドナー、アクセプターの蛍光強度を測定し、エネルギー移動効率を調べることで、2 つの蛍光分子の相対的空間配置 (距離と方向) について知見を与える。

具体的には、アクチン分子内にドナー、アクセプター色素を導入し、それら 1 分子の蛍光強度を同時にモニター、あるいは分光してスペクトルをとった。すでに、サブユニット (TnI-TnC) 間では、蛍光エネルギー移動効率が秒オーダーのゆっくりした変化をしていることが示されている。このことは、サブユニット間で遅い構造のゆらぎがあるらしいことを示唆するものである (Ishii et al. 1997)。一方、GFP は、蛍光を発するタンパク質であるが、1 分子の蛍光を観測すると、秒オーダーで蛍光が変化し、1 分子内の遅いコンフォメーションゆらぎがあるらしい (Dickson et al., 1997)。これらの実験結果を説明するためには、タンパク質のコンフォメーションは、唯一ではなくいくつかあり、その間をいたりきたりしていると考えればつじつまがあう。タンパク質の機能はその 3 次元構造に大きく依存しているが、一般的に、タンパク質の構造は、Anfinsen のモデル: 「アミノ酸配列に従って自発的に折りたたまれ自由エネルギー最小値のところで安定化されている。」と、考えられている (Anfinsen, 1973)。一方、タンパク質の構造の柔軟性をとりいれ、タンパク質は自由エネルギー最小値に非常に近い値をもつ準安定な極小構造を多数もち、熱エネルギーによってそれらの極小構造間をゆらいでいるという考え方もされるようになってきた (Frauenfelder et al., 1991)。この構造のゆらぎがタンパク質の機能に重要であると思われる。たとえば、筋収縮をおこなうアクチン系では、エネルギー源である化学物質 ATP の熱ゆらぎ ($\sim k_B T$) とあまり大きさの変わらない比較的小さい入力化学エネルギーを力学エネルギーに変換する。従来のアボガドロ数

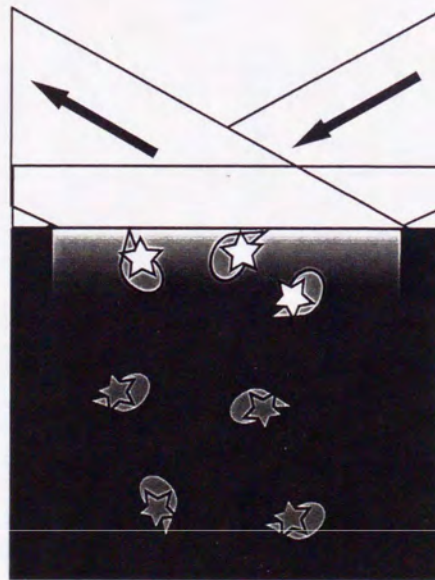
のオーダーの分子の平均値では、この構造のゆらぎは測定できない。

この研究では、アクチンを例にとり、すでに構築した 1 分子蛍光エネルギー移動分光顕微鏡で、動的なタンパク質 1 分子内の構造のゆらぎを測定した。

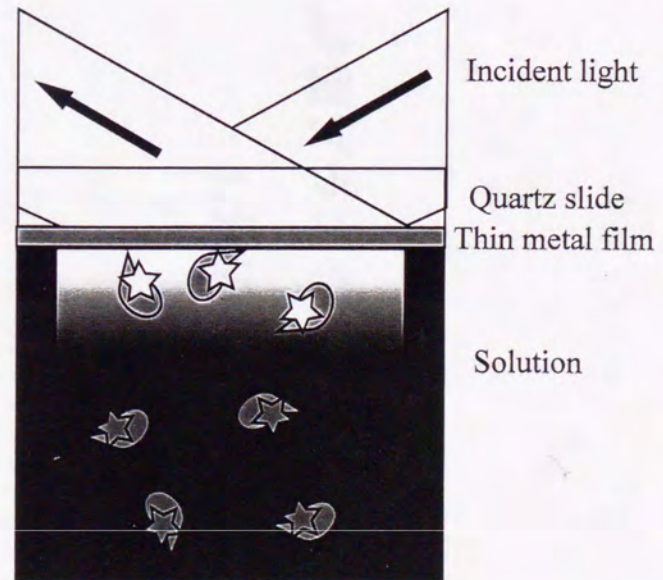




(a) Epi-fluorescence microscopy



(b) Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM)



(c) Surface plasmon resonance fluorescence microscopy (SPRFM)

図1 照明法の比較

2.表面プラズモン共鳴によるタンパク質 1 分子のイメージング

2.1 目的

表面プラズモン共鳴 (SPR) は、金属の電子密度波 (プラズマ波、量的にはプラズモン) が金属表面を伝搬する現象 (Raether, 1988) である。この共鳴現象により、金属表面の電子が振動し電磁波が発生する。その表面方向の伝搬速度は金属の外側の媒質の光速より遅いので、発生する電磁波の波数は振動数で決まる波数より大きく、結局、発生する電場は金属表面から指数関数的に減衰する場、すなわちエバネッセント場となる。我々は、金属表面の上の蛍光標識されたタンパク質の 1 分子のイメージングに、この金属薄膜と溶液の境界の表面プラズモン共鳴によって発生したエバネッセント光を用いた (図 1(c))。エバネッセント場は、溶液中で 100 ~ 200nm の表皮厚さであり金属表面の近くに局在している。さらに、表面プラズモンによって生じた電磁場は、その伝搬長が、金属なしの場合の全反射型のエバネッセント場よりも、一般的に長いと強いという特長もある。

金属表面は、タンパク質や脂質の自己集合 (self-assembly) や自己組織化 (self-organization) を起こさせる独特の性質を持っている (Bain and Whitesides, 1988, Lang *et al.*, 1994)。いくつかの種類自己集合 (self-assembly) や自己組織化 (self-organization) は、金、銀、白金、銅などの金属上と硫黄原子による共有結合によって実現されている。金属表面上の秩序だった超分子構造は、細胞の機能である分子認識、信号伝達などの重要な役割を果たしている細胞膜のような 2 次元システムのさらなる理解に欠かせないものである Müller *et al.*, 1993, Duschl *et al.*, 1994, Sasaki *et al.*, 1997)。

金属表面の上記のような性質を研究に生かすために、表面プラズモン共鳴を用いて、蛍光 1 分子イメージングをおこない、金属表面上で活性のあるタンパク質分子 1 分子の挙動を観察することを試みた。

2.2全反射 (TIR) と表面プラズモン共鳴 (SPR)

2.2.1全反射 (TIR)

エバネッセント波あるいは電場としてのエバネッセント場がよく知られているのは、高屈折率物質 (例えば、石英 $n_1=1.46$) から低屈折率媒質 (例えば、水 $n_2=1.33$) に、全反射条件で光を入射させた時にできる低屈折率媒質側にしみだす場としてである (図2、Axelrod, 1989)。全反射条件では、低屈折率媒質に光は透過せず、すべての入射パワーが入射側に戻る。光線光学的には、全反射角で入射した光は一旦低屈折率媒質にしみだして、Goos-Hänchenシフトの後、入射側に戻って行くと解釈される (図2、辻内、1979)。

全反射条件におけるエバネッセント波の波長は、高屈折率媒質側の波の境界面での波長 (すなわち境界面方向成分) と一致し、したがって、その波長は、高屈折率媒質中の波長によって決まり、空気中での伝搬光より短い波長となりうる。

赤外及び蛍光分光分析の分野においては、エバネッセント波の、境界面から離れるにしたがって電場が減衰する性質を利用して、表面や薄膜の分光分析や、深さ分析が行われている。また、水溶液環境の中で、境界面に非常に近いところにある蛍光分子のみ選択的に励起するので、TIRFMとして用いられ、細胞の観察や、FPRやFCRと組み合わせて、表面近くの分子の向き、回転やFRETを検出したりして、表面のキネティクスの測定に応用されている (Axelrod, 1989)。

エバネッセント波の境界面からの減衰の減衰の度合いは、

$$I = I_0 \exp \left\{ -2kz \left[\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right]^{1/2} \right\} \quad (1)$$

で表される (n_1 : 高屈折率媒質の屈折率、 n_2 : 低屈折率媒質の屈折率)。

光源が可視光の場合、skin depth (光強度が $1/e$ になる深さ) d は、100 ~ 200nmになる。図3に、様々な入射光の波長がしみだし深さの入射角依存性を示した。

臨界角

全反射が、起こるか起こらないかの、境界の入射角を臨界角という（図2）。用いた系では、石英（ $n_1=1.46$ ）、水（ $n_2=1.33$ ）系なので、臨界角は 65.638° （ $=\sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$ ）となる。

Goos-Häschenシフト

全反射をさらに詳しく検討すると、入射して全反射する光は x 方向に進行してから反射するように見える。この距離を Goos-Häschen シフトといい、電場が入射面に垂直な直線偏光の場合には以下のようなになる（辻内、1979）。

s 偏光：

$$l_s = \frac{1}{\pi n_1} \frac{\mu_{12} \sin \theta_1 \cos \theta_1}{\mu_{12}^2 \cos^2 \theta_1 + \sin^2 \theta_1 - n_{12}^2} \frac{\lambda}{\sqrt{\sin^2 \theta_1 - n_{12}^2}}, \mu_{12} = \frac{\mu_2}{\mu_1} \quad (2)$$

p 偏光：

$$l_p = \frac{1}{\pi n_1} \frac{\frac{n_{12}^4}{\mu_{12}} \sin \theta_1 \cos \theta_1}{\frac{n_{12}^4}{\mu_{12}^2} \cos^2 \theta_1 + \sin^2 \theta_1 - n_{12}^2} \frac{\lambda}{\sqrt{\sin^2 \theta_1 - n_{12}^2}} \quad (3)$$

図4に、入射光の波長が 532nm でp偏光の場合の、Goos-Häschenシフトの入射角依存性を示した。

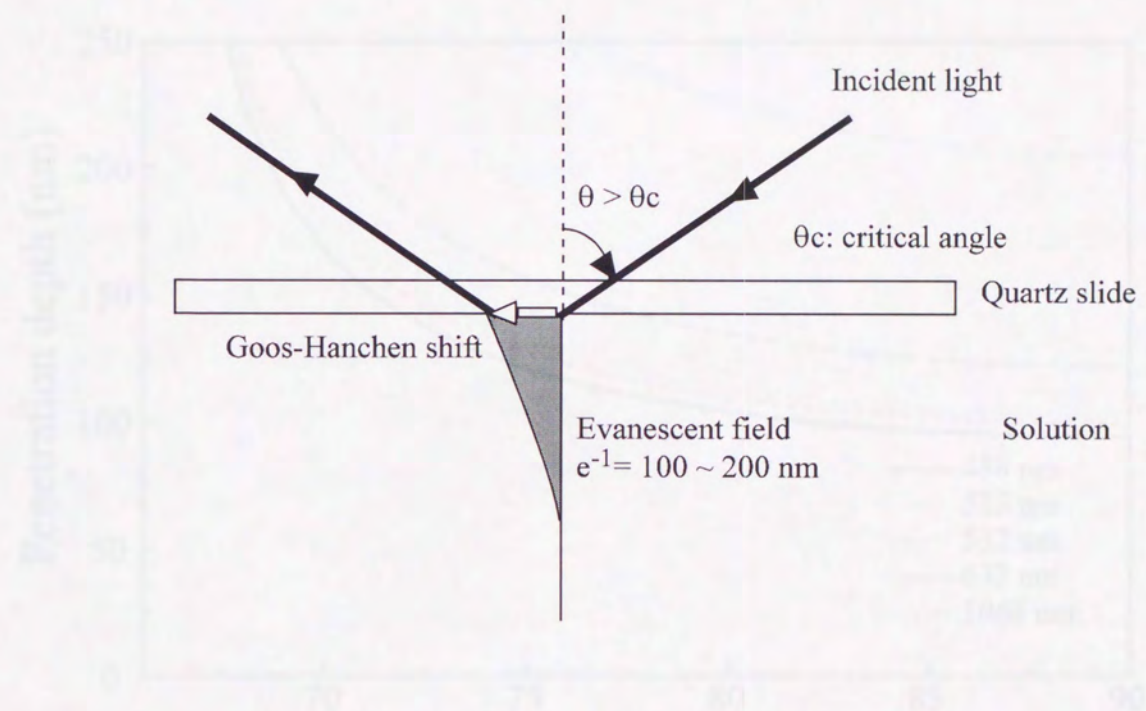


図2 Goos-Hanchenシフト、しみだし深さの概念図

図1: TIRしきり線での入射角の条件
 * 射角の条件: $45^\circ, 55^\circ, 65^\circ, 75^\circ, 85^\circ$ (空気比: $n_1 = 1.49$, $n_2 = 1.33$)
 * 射角の条件: $n_1 \sin \theta > n_2$ として計算した。

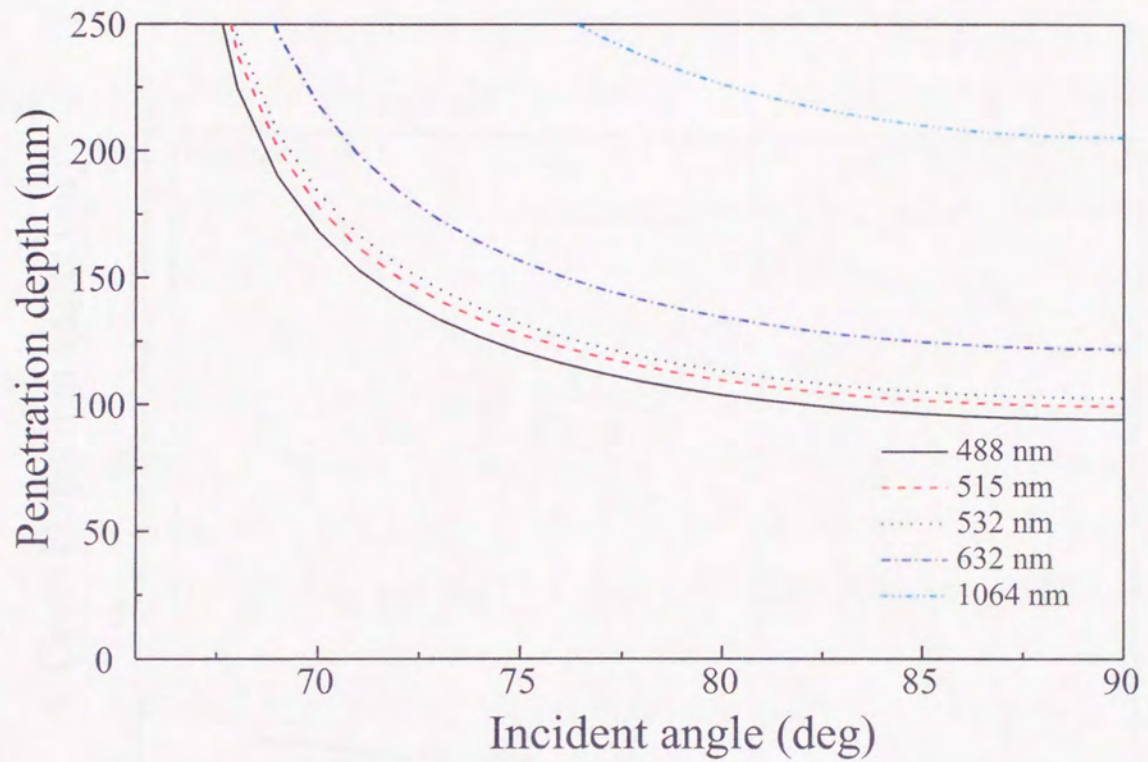


図3 TIRしみだし深さの入射角依存性
 入射光の波長：488nm, 515nm, 532nm, 632nm, 1064nm。高屈折率媒質 ($n_1 = 1.46$)、
 低屈折率媒質 ($n_2 = 1.33$) として計算した。

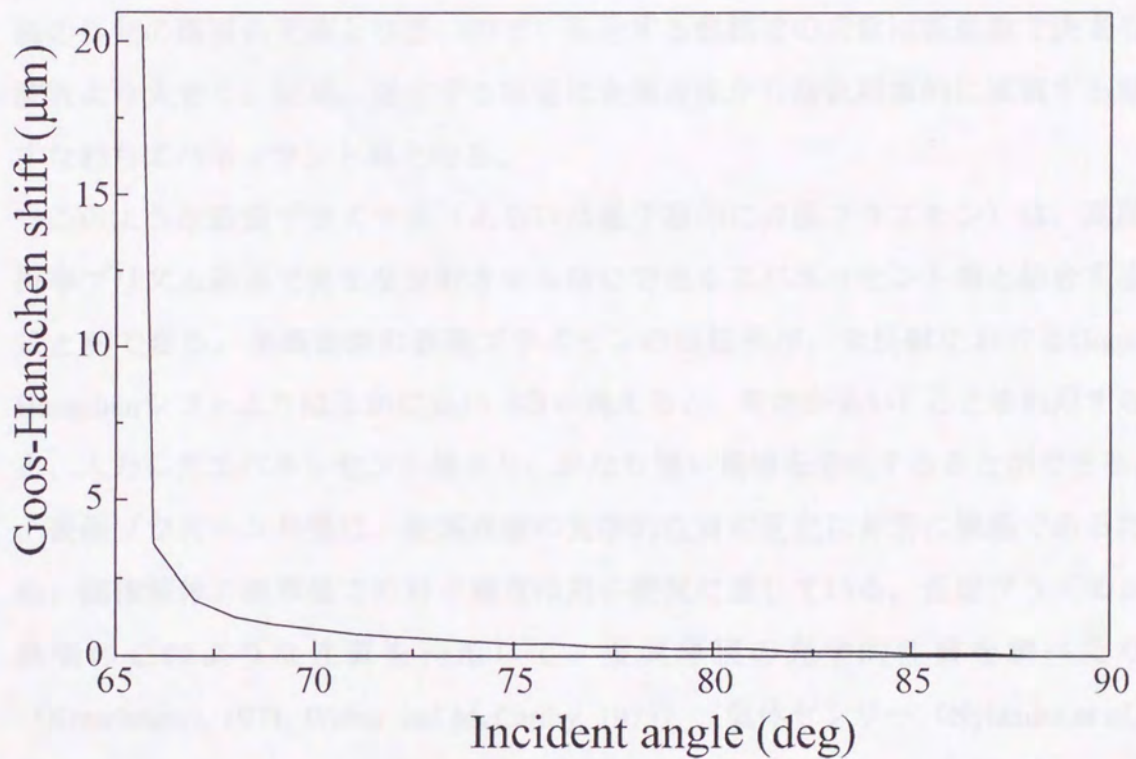


図4 Goos-Hanschenシフトの理論計算（入射光の波長は532nm、p偏光）
 全反射条件では、低屈折率媒質に光は透過せず、すべての入射パワーが入射側に戻るが、光線光学的には、全反射角で入射した光は一旦低屈折媒質にしみだして、Goos-Hanschenシフトの後、入射側に戻って行くと解釈される。

2.2.2表面プラズモン共鳴 (SPR)

プラズモン：金属内での伝導電子気体の集団的な縦波励起

表面プラズモン (Raether, 1988) は、金属境界面上でのコヒーレントな電荷のゆらぎである。この金属の電子密度波 (プラズマ波) が金属表面を走るとき、金属表面の電子の振動により電磁波が発生する。その表面方向の伝搬速度は金属の外側の媒質の光速より遅いので、発生する電磁波の波数は振動数で決まる波数より大きく、結局、発生する電場は金属表面から指数関数的に減衰する場すなわちエバネッセント場となる。

このような表面プラズマ波 (あるいは量子論的に表面プラズモン) は、高屈折率プリズム裏面で光を全反射させる時にできるエバネッセント場と結合することができる。金属表面の表面プラズモンの伝搬長が、全反射におけるGoos-Hänchenシフトよりはるかに長い (言い換えると、寿命が長い) ことを利用すると、入力したエバネッセント場より、かなり強い電場を形成することができる。

表面プラズモン共鳴は、金属表面の光学的性質の変化に非常に敏感であるため、固体液体の境界面での分子相互作用の研究に適している。表面プラズモン共鳴のこのような性質を利用して、金属薄膜の光学的性質を調べたり (Kretschmann, 1971, Weber and McCarthy, 1975)、気体センサー (Nylander *et al.*, 1982/83, Liedberg *et al.*, 1983)、液体センサー (Matsubara *et al.*, 1988, Kano and Kawata, 1995)、pHセンサー (Egami *et al.*, 1996) に応用されたりしている。さらに、金属上のself-assembled monolayerの特異的な認識反応にも用いられている (図21)。この方法の最初の生物学的応用は、銀薄膜上でのarachidate単層の集合の解析である。その後、表面プラズモン共鳴は、単層の脂質、化学吸着した多層のタンパクやタンパク-タンパク相互作用の研究に用いられてきた (Löfås and Johnson, 1990, Stenberg *et al.*, 1991, Salamon *et al.*, 1994)。

また、表面プラズモン共鳴は、金属表面にある試料のスペクトル信号の増強のためにも使用されてきた。それは、試料が粗い金属表面上、あるいはその近傍にある場合、分子の光学的性質が劇的に変化するからである。この現象は、表面電場増強 (Weber and Ford, 1981)、非線形光学現象である多光子吸収、高

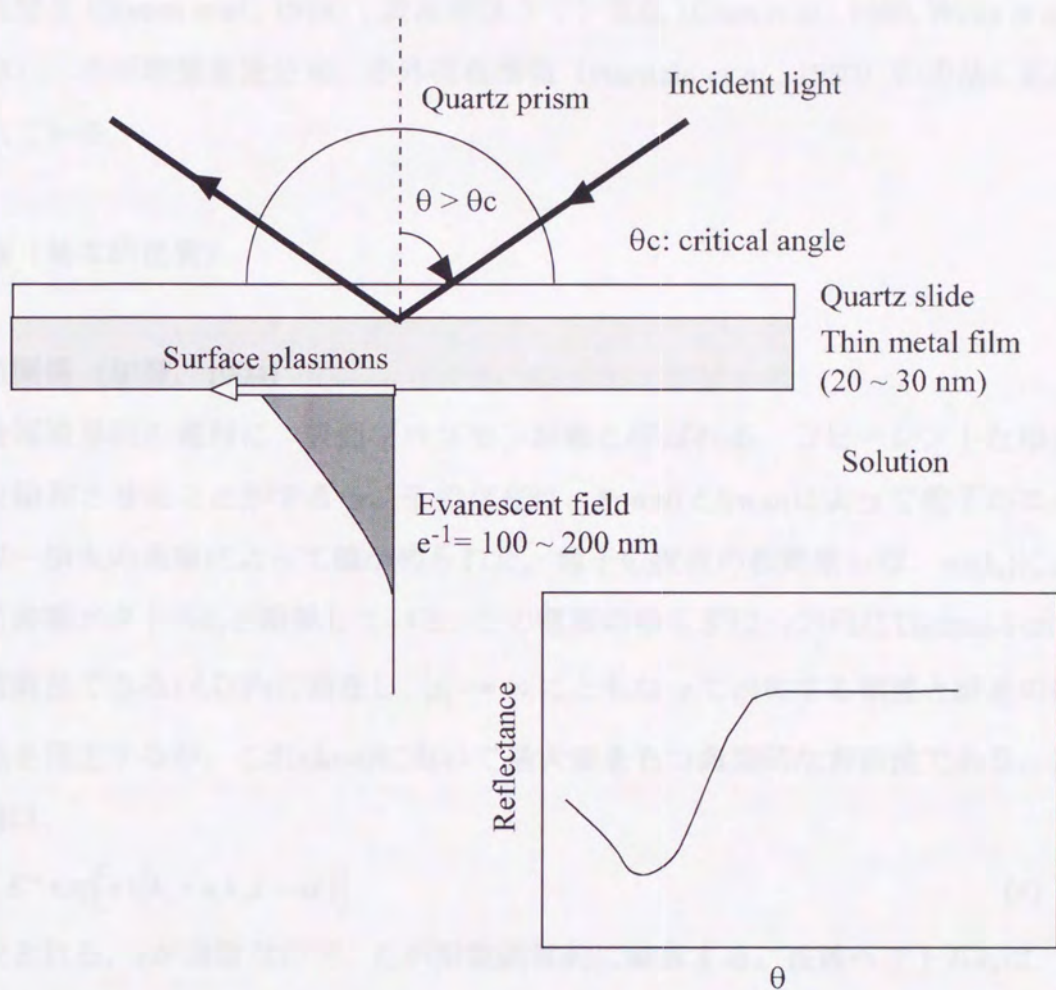


図5 表面プラズモンの概念図

表面プラズモンは、Kretschmann-Raether型の方法 (Raether, 1988) で発生させた。レーザーの入射角をコンピュータ制御で変化させ、反射光の強度を、パワーメーターで測定した。表面プラズモンが励起されているときは、反射光強度が減少する。

調波発生 (Simon *et al.*, 1974)、表面増強ラマン散乱 (Chen *et al.*, 1980, Weitz *et al.*, 1983)、表面増強蛍光分光、赤外吸収増強 (Harstein *et al.*, 1980) の方法に応用されている。

理論 (基本的性質)

分散関係 (加野, 1994)

金属境界面の電荷に、表面プラズモン振動と呼ばれる、コヒーレントなゆらぎを励起させることができる。その存在は、PowellとSwanによって電子のエネルギー損失の実験によって確かめられた。電子の縦波の振動数 ω は、 $\omega(k_x)$ によって波数ベクトル k_x と関係している。この電荷のゆらぎは、 z 方向にThomas-Fermiの遮蔽長である 1\AA 以内に局在し、 $|z| \rightarrow \infty$ にともなって消失する横波と縦波の電磁波を発生するが、これは $z=0$ において最大値をもつ典型的な表面波である。この場合は、

$$E = E^z \exp[+i(k_x x \pm k_z z - \omega t)] \quad (4)$$

で表される。 z が虚数なので、 E_z が指数関数的に減衰する。波数ベクトル k_x は、 x 方向に平行な方向を向いていて、 $k_x = 2\pi/\lambda_p$ である。ここで、 λ_p はプラズマ振動の波長である。

半無限金属表面に励起される表面プラズモンの伝搬定数

金属と誘電体の境界面を伝搬する表面プラズモンの伝搬定数は、Maxwell方程式と、境界における電場、磁場の連続条件から求められる。以下にその方法を示す。

図6のように、誘電体 (媒質I) に接した固体金属 (媒質II) を考える。媒質I、媒質IIのそれぞれの誘電率を ϵ_1 、 ϵ_2 とする。入射光がp偏光の場合、電場、磁場の各成分は、

$$\begin{aligned} E &= (E_x, 0, E_z) \\ H &= (0, H_y, 0) \end{aligned} \quad (5)$$

と、表される。

Maxwellの方程式より、

$$\nabla \times H = \varepsilon \frac{\partial E}{\partial t} \quad (6)$$

また、表面プラズモンのつくる電場の時間変化を表す項が、 $\exp(-i\omega t)$ で与えられるとき、

$$-\frac{\partial H_y}{\partial z} = \varepsilon \frac{\partial E_x}{\partial t} = -i\omega\varepsilon E_x \quad (7)$$

$$\frac{\partial H_y}{\partial x} = \varepsilon \frac{\partial E_z}{\partial t} = -i\omega\varepsilon E_z \quad (8)$$

となる。

ここで、表面プラズモンのつくる電磁場は境界面から指数関数的に減衰することから、媒質I、IIにおける減衰定数を k_{z1} 、 k_{z2} とおくと、磁場はそれぞれ次のようになる。

$$\text{媒質I: } H_{y1} = A \exp(-k_{z1}z) \exp(ik_x x) \quad (9)$$

$$\text{媒質II: } H_{y2} = B \exp(k_{z2}z) \exp(ik_x x) \quad (10)$$

上式より、それぞれの媒質中の電場の x 方向の成分は、

$$\text{媒質I: } E_{x1} = \frac{1}{i\omega\varepsilon_1} A(-k_{z1}) \exp(-k_{z1}z) \exp(ik_x x) \quad (11)$$

$$\text{媒質II: } E_{x2} = \frac{1}{i\omega\varepsilon_2} Bk_{z2} \exp(k_{z2}z) \exp(ik_x x) \quad (12)$$

と表せる。

媒質Iと媒質IIの境界面における、電場、磁場の境界面と平行な成分の連続条件は、

$$\begin{aligned} E_{x1} &= E_{x2} \\ H_{y1} &= H_{y2} \end{aligned} \quad (13)$$

であるので、

$$\begin{pmatrix} \exp(-k_{z1}z) & -\exp(k_{z2}z) \\ \frac{k_{z1} \exp(-k_{z1}z)}{\varepsilon_1} & \frac{k_{z2} \exp(k_{z2}z)}{\varepsilon_2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (14)$$

が成り立たなければならない。(14)式において、 A 、 B が非自明解を持つためには、

$$\varepsilon_2 k_{z1} + \varepsilon_1 k_{z2} = 0 \quad (15)$$

を満たさなければならない。

$$\text{ここで、} |k|^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \varepsilon \quad (16)$$

の関係式が成り立ち、今の場合、

$$k_x^2 + (ik_{zn})^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \varepsilon_n \quad (17)$$

となる。よって、

$$k_x = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (18)$$

が得られる。

(15)式を満たすには、 ε_1 、 ε_2 のどちらかが負でなくてはいけない。誘電率の実数部分が負になる媒質には金属があり、金属表面において、(15)式が成り立つことがわかる。これに対して、誘電体-誘電体の境界面では、(15)式で与えられるモードは存在しない。

金属薄膜表面に励起される表面プラズモンの伝搬定数

次に、金属薄膜表面に励起される表面プラズモンの伝搬定数を求める。金属(II)誘電体(I, III)にはさまれた3層のモデルを考える(図6)。金属薄膜の厚さは d とし、媒質I、II、IIIの誘電率をそれぞれ、 ε_1 、 ε_2 、 ε_3 とする。このモデルにおいて境界面を x 軸方向に進行する表面プラズモンを考える。それぞれの媒質内の磁場を以下のおく。

$$\text{媒質I: } H_{y1} = A \exp(-k_{z1}z) \quad (19)$$

$$\text{媒質II: } H_{y2} = B \exp(k_{z2}z) + C \exp\{k_{z2}(d-z)\} \quad (20)$$

$$\text{媒質III: } H_{y3} = D \exp\{k_{z3}(z-d)\} \quad (21)$$

それぞれの媒質中の電場の x 軸方向の成分 E_{x1} 、 E_{x2} 、 E_{x3} を求め、境界条件、

$$E_{x1} = E_{x2}, H_{y1} = H_{y2} \text{ at } z = 0 \quad (22)$$

$$E_{x2} = E_{x3}, H_{y2} = H_{y3} \text{ at } z = d \quad (23)$$

を適用する。そして、 A 、 B 、 C 、 D が、式(15)と同様に、非自明解をもつための条件は、

$$(\varepsilon_2 k_{z1} + \varepsilon_1 k_{z2})(\varepsilon_3 k_{z2} + \varepsilon_2 k_{z3}) + (\varepsilon_2 k_{z1} - \varepsilon_1 k_{z2})(\varepsilon_3 k_{z2} - \varepsilon_2 k_{z3}) \exp(2k_{z2}d) = 0 \quad (24)$$

となる、金属の厚さが十分厚いとき、

$$(\varepsilon_2 k_{z1} + \varepsilon_1 k_{z2})(\varepsilon_3 k_{z2} + \varepsilon_2 k_{z3}) = 0 \quad (25)$$

となる。

金属の厚さが十分厚いときは、(25)式から媒質Iと媒質II、媒質IIと媒質IIIの境界面に、それぞれの境界面に接する2媒質の誘電率だけに依存して伝搬定数が決まる表面プラズモンが励起される。これは、半無限金属表面に励起される表面プラズモンの場合と一致する。一方、金属薄膜の場合は、(24)式より、反対面側の境界面の影響が指数関数的に増大し、伝搬定数が影響を受ける。

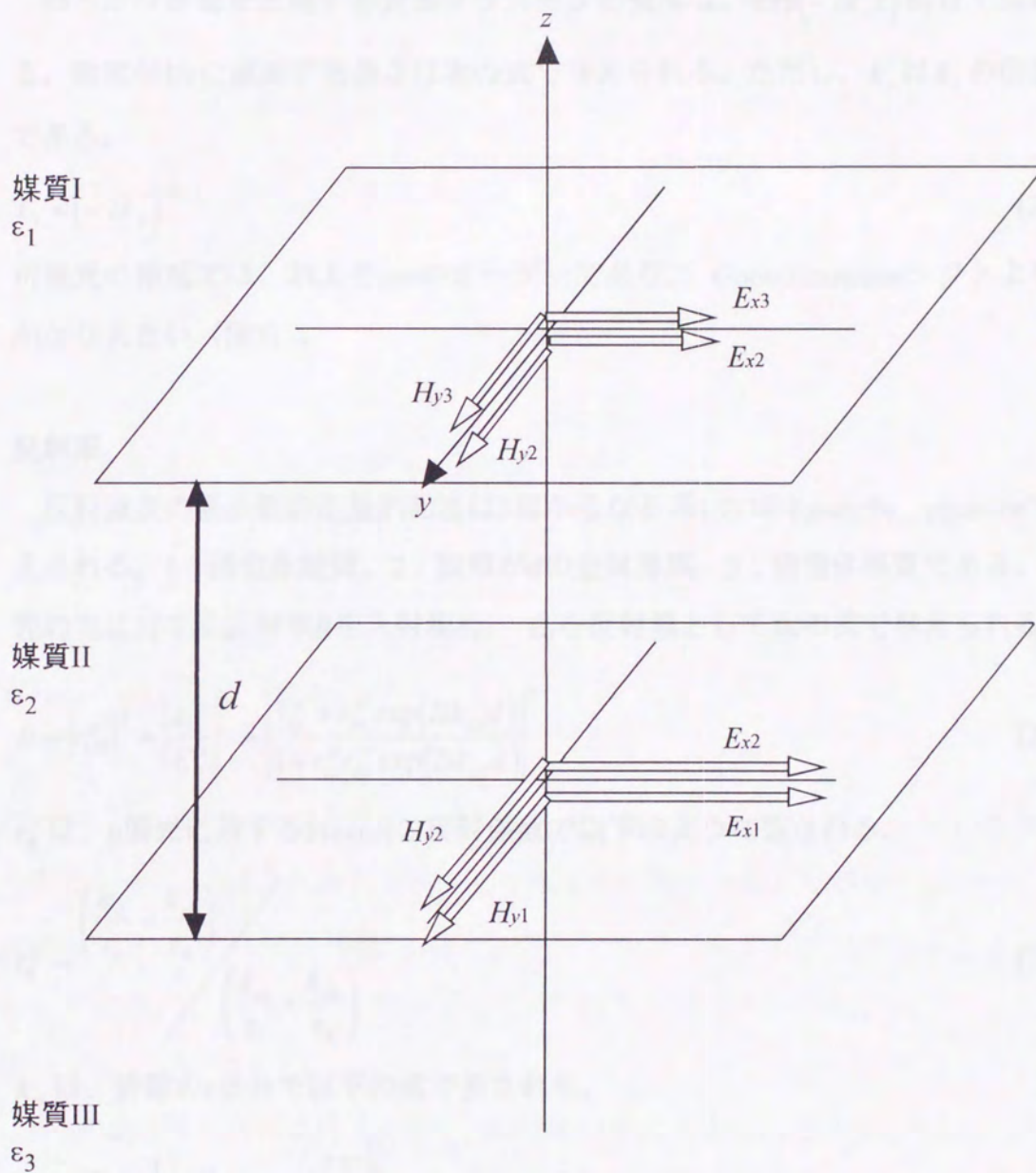


図6 3層膜系のモデル図

伝搬長

滑らかな表面を伝搬する表面プラズモンの強度は、 $\exp(-2k_x''x)$ 割合で減衰する。強度が $1/e$ に減衰する長さは次の式で与えられる。ただし、 k_x'' は k_x の虚数部である。

$$L_i = (-2k_x'')^{-1} \quad (26)$$

可視光の領域では、およそ μm のオーダーであり、Goos-Hänchenシフトよりもかなり大きい(図7)。

反射率

反射強度の最小値の定量的記述は3層からなる系1/2/3のFresnel's equationで与えられる。1:誘電体媒質、2:膜厚が d の金属薄膜、3:誘電体媒質である。p偏光の光に対する反射率 R を入射場 E_0 、 E_r を反射場として次の式で与えられる。

$$R = |r_{123}^p|^2 = \left| \frac{E_r^p}{E_0^p} \right|^2 = \left| \frac{r_{12}^p + r_{23}^p \exp(2ik_{z2}d)}{1 + r_{12}^p r_{23}^p \exp(2ik_{z2}d)} \right|^2 \quad (27)$$

r_{ik}^p は、p偏光に対するFresnelの反射係数で以下のように表される。

$$r_{ik}^p = \frac{\left(\frac{k_{zi}}{\epsilon_i} - \frac{k_{zk}}{\epsilon_k} \right)}{\left(\frac{k_{zi}}{\epsilon_i} + \frac{k_{zk}}{\epsilon_k} \right)} \quad (28)$$

k_{zi} は、波数の z 成分で以下の式で表される。

$$k_{zi} = \frac{2\pi}{\lambda} n_i \left[1 - \left(\frac{n_1}{n_i} \sin \theta \right)^2 \right]^{-\frac{1}{2}} \quad (29)$$

表面プラズモンによる場の増幅

もし、反射強度が最小値をとったとき、表面の電磁波の強度は最大値に達する。増幅の値は金属薄膜が存在するときとしないときの、Fresnelの透過係数の絶対値の2乗の比で表される。

$$T = \frac{T_{\text{metal}}}{T_{\text{no metal}}} = \frac{\left| \frac{t_{12}t_{23} \exp(ik_{z2}d_2)}{1 + r_{12}r_{23} \exp(2ik_{z2}d_2)} \right|^2}{|t_{13}|^2} \quad (30)$$

$t_{ik}^p = 1 + r_{ik}^p$ の関係があり、

$$t_{ik} = \frac{2k_{zi}}{\varepsilon_i} \left/ \left(\frac{k_{zi}}{\varepsilon_i} + \frac{k_{zk}}{\varepsilon_k} \right) \right. \quad (31)$$

である。

光による表面プラズモンの励起 (Raether, 1988)

表面プラズモンを光励起するためには、励起光は次の2つの条件を満たさなければならない。

第1の条件は、電磁場の波数が表面プラズモンの伝搬定数と一致しなければならないことである (共鳴条件)。

$$k_x = k_{sp} \quad (32)$$

図8に示したように、表面プラズモンの伝搬定数 k_{sp} は、金属に接した光の波数ベクトルの大きさ $|k_i|$ よりも大きい。したがって、これと同じ波数をもつ光は、金属に接した媒質中では、伝搬条件を満たすことができず、エバネッセント場となっている。したがって、表面プラズモンはエバネッセント場によってのみ光励起することができる。

第2の条件は、金属表面にp偏光の電磁場が存在することである。

光で表面プラズモンを励起するには、全反射を利用する方法と回折格子を利用する方法が提案されている。光学系には全反射を利用する方法を用いた。

a) 全反射を利用する方法

もし、光が誘電体媒質でおおわれた金属表面で反射したとすると、その波数の境界面に対する射影は次の式で与えられる。

$$k_x = \sqrt{\epsilon_3} \frac{\omega}{c} \sin \theta_i \quad (33)$$

(33)式において、 $\theta_i > \theta_c$ なので

$$k_x > |k_3| = \sqrt{\epsilon_3} \frac{\omega}{c} \quad (34)$$

である。(34)式より、低屈折率媒質中に生じる光の波数は、その媒質における光のベクトルの大きさよりも大きくなることがわかる。さらに、

$$k_x^2 + k_z^2 = |k_3|^2 \quad (35)$$

より、低屈折率媒質中に生じる光の波数は、境界面に対して垂直な方法には、虚数となる。そのため、エバネッセント場の電場は、境界面から離れるにしたがって指数関数的に減衰する。このことにより、全反射の結果、エバネッセント波が生じることが分かる。

全反射を利用して、表面プラズモンを励起する光学配置には、図9に示したOtto配置とKretschmann-Raether配置などが提案されている。

Otto配置は、高屈折率プリズム、低屈折率媒質、バルク金属からなる。高屈折率プリズムから、臨界角を変えて光が入射すると、低屈折率媒質中にエバネッセント場が発生する。金属表面をエバネッセント場内におくと、金属表面に表面プラズモンが励起される。

Kretschmann-Raether配置は、高屈折率プリズム、金属薄膜、低屈折率媒質からなる。高屈折率媒質から、臨界角を越えて光が入射すると、エバネッセント場が発生する。エバネッセント場は金属薄膜を通り抜け低屈折率媒質中にしみ出す。これによって、金属薄膜と低屈折率媒質の境界面に表面プラズモンが励起される。

図8に、全反射を利用した励起法の原理を波数ベクトルを用いて表した。金属に接した媒質中での光の波数は、プリズム側から臨界角で入射した光の波数に相当する。臨界角より大きい角度で入射した光の波数は、エバネッセント場の領域に存在する。(34)式で示したように、金属に接する媒質中での、境界面に平行な方向の光の波数は、屈折率と入射角によって与えられるので、これらの値

を適当に選べば、境界面に平行な方向の光に波数と、表面プラズモンの伝搬定数を一致させることができる。これにより表面プラズモンを発生させることができる。

金属薄膜の交換の利便性から、Kretschmann-Raether配置の改良版の装置を作成し用いた(図5)。

b) 回折格子を利用する方法

回折によって、回折格子表面にエバネッセント場を発生させる。xz面に波数ベクトルをもつ光が回折格子表面に、入射角 θ_i で入射したとすると、回折格子で生成されるm次回折光のx方向の波数成分 k_{mdx} は、

$$k_{mdx} = |\mathbf{k}_i| \sin \theta_i + m k_g \quad (36)$$

と表せる。ここで k_g は回折格子の格子ベクトルを表す。回折光のx方向の波数成分が格子ベクトルの大きさ $|\mathbf{k}_i|$ よりも大きくなると、回折光はエバネッセント場になる。回折格子表面への入射角を適当に選ぶと、(36)で表される回折光のx方向の波数成分が表面プラズモンの波数と一致し、表面プラズモンを発生させることができる。

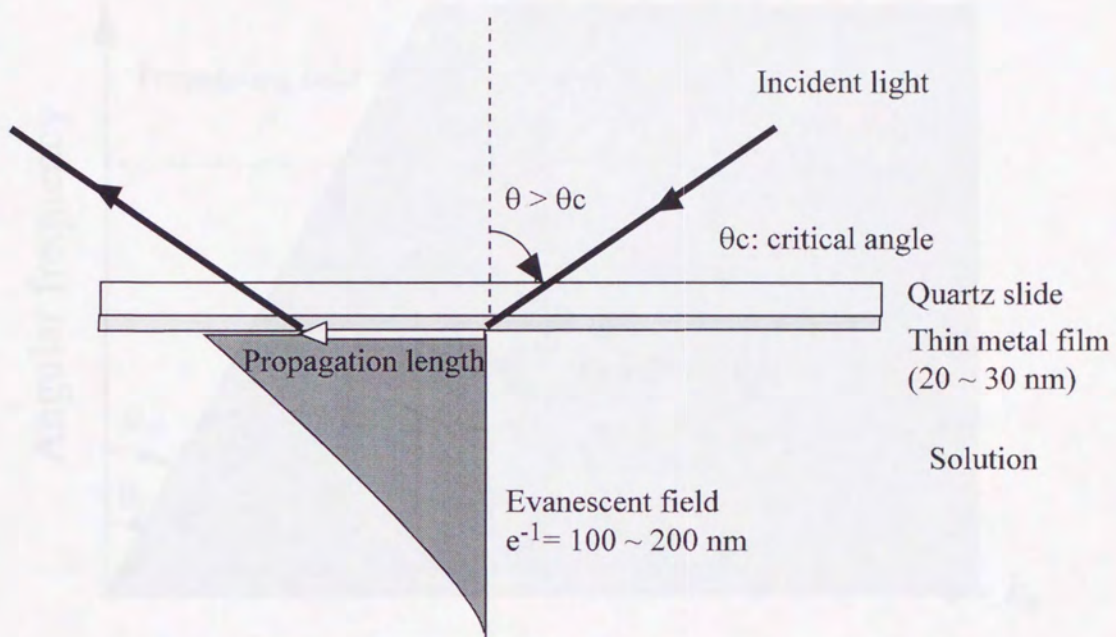


図7 Propagation lengthの概念図

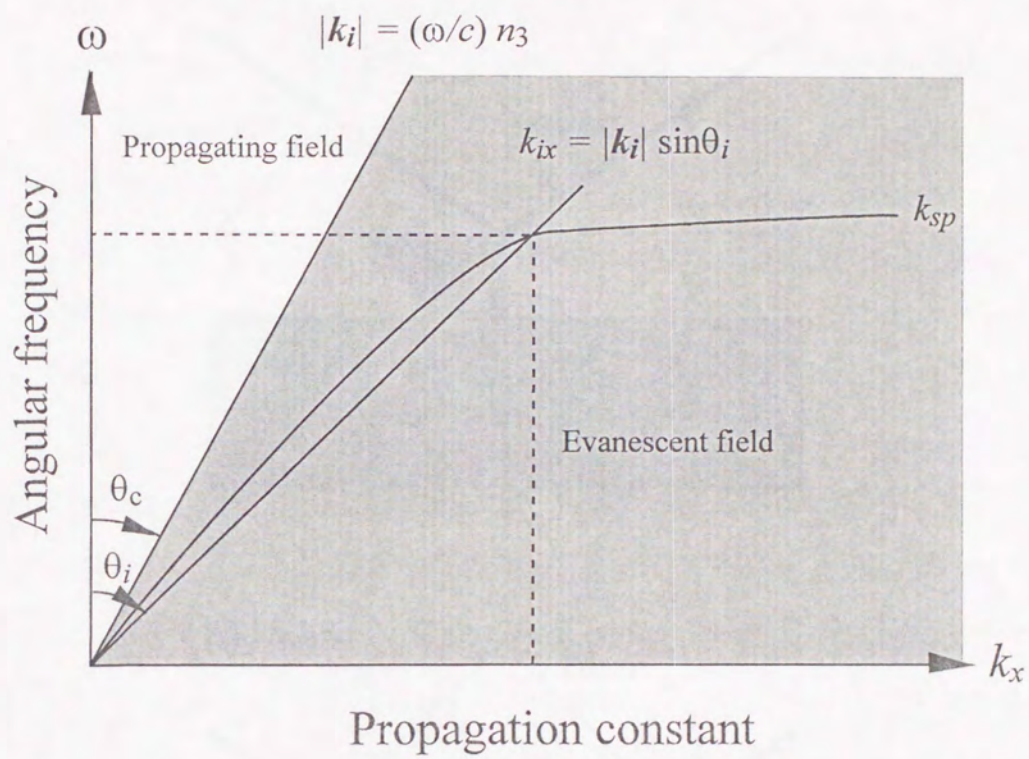


図8 全反射を利用した表面プラズモン励起の原理

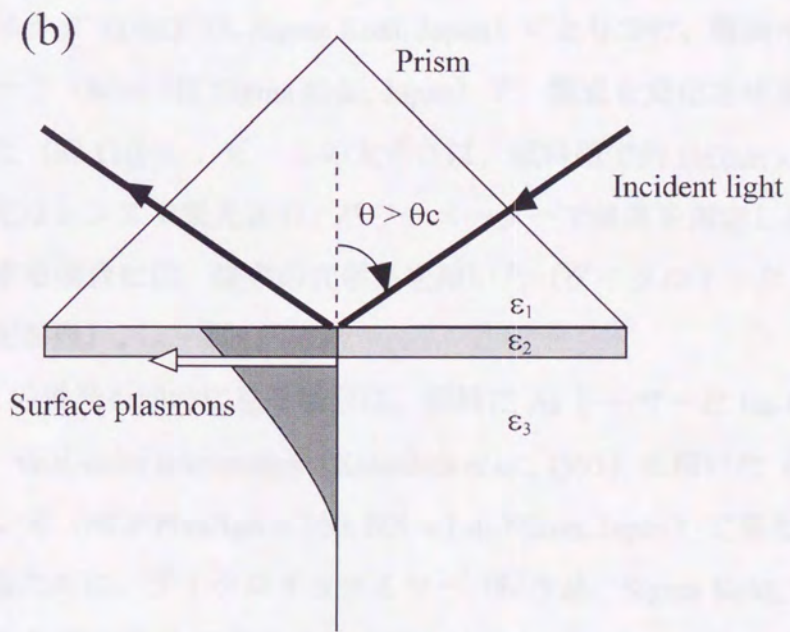
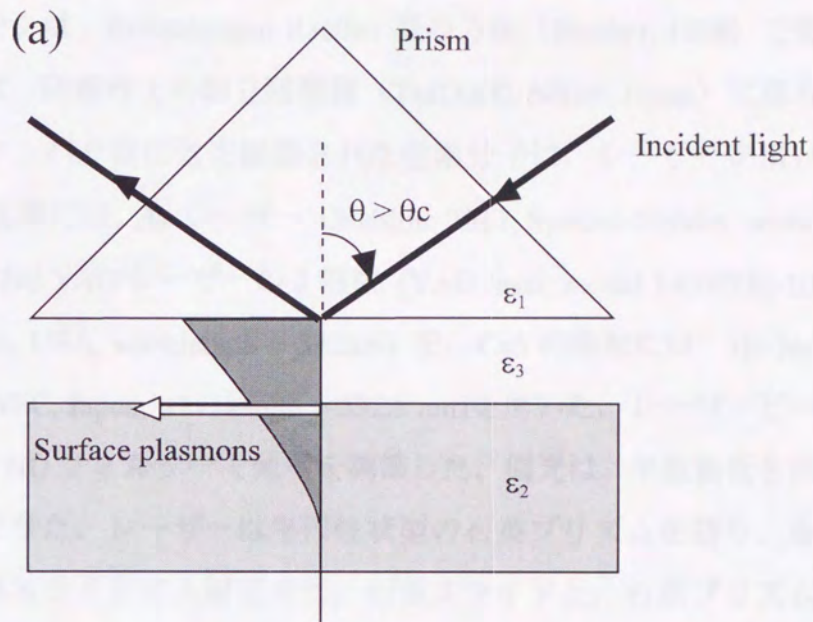


図9 光による表面プラズモンの励起方法
 (a)Otto配置。(b)Kretschmann-Raether配置。

2.3 光学系

表面プラズモンは、Kretschmann-Raether 型の方法 (Raether, 1988) で発生させた。実験装置は、防振台上の倒立顕微鏡 (TMD300, Nikon, Japan) に組み立てた。金属上にあるタンパク質に蛍光標識された色素分子は、レーザーを用いて励起した。TMR 励起用には、Ar レーザー (Stabilite 2017, Spectra-Physics, wavelength = 514.5 nm) か、Nd:YAG レーザーの 2 倍波 (YAG laser, model 140-0532-100, Light Wave Electronics, USA, wavelength = 532nm) を、Cy5 の励起には、He-Ne レーザー (GLG5410, NEC, Japan, wavelength = 632.8 nm) を用いた。レーザービームはレンズで集光し、ND フィルターで強度を調節した。偏光は、半波長板を回転させることで変化させた。レーザーは半円柱状型の石英プリズムを通り、金属薄膜を蒸着した石英スライドに入射させた。石英スライドと、石英プリズムの間の空間は、屈折率マッチングオイルで満たした。レーザーの入射角は、ミラーを電動マイクロメータ (DMY-15, Sigma Koki, Japan) にとりつけ、電動マイクロメータコントローラ (Mini-5D, Sigma Koki, Japan) で、焦点を変化させることなくスキャンさせた (図 11(b))。ビームの大きさは、試料面で約 $100\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$ であった。反射光はレンズで集光され、パワーメーターで強度を測定した。1 色の蛍光像を観察する場合には、従来の光学系を用いた (ダイクロイックミラー等、光学部品は下記参照)。

TMR と Cy5 の蛍光を同時に見る場合は、同時に Ar レーザーと He-Ne レーザーを入射させ、dual-color microscopy (Kinoshita *et al.*, 1991) を用いた (図 13)。蛍光は対物レンズ (NCF PlanApo $\times 100$; NA = 1.4; Nikon, Japan) で集光し、二色蛍光を分離するために、ダイクロイックミラー (特注品、Sigma Koki, Japan) に通した。分離した蛍光は背景光を減少させるためにバリアーフィルター (BF, 580DF30 for TMR and 670DF40 for Cy5, Omega Optical, USA) に通し、ISIT カメラ (C2400-08 and C2400-80H, Hamamatsu Photonics, Japan) で観察した。蛍光強度の定量には、IICCD カメラ (C2400-87, Hamamatsu Photonics, Japan) を用いた。II は、VS4-1845, Video Scope International, USA を用いた。

2.4 材料

タンパク質の調製

アクトミオシン系

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 (1971) の方法で精製した。実験で用いたミオシンはウサギの骨格筋より抽出し、Szent-Gyögyi (1951) の方法で精製した。H-メロミオシン (HMM) は、Weeds と Pope の方法 (1977) によって、ウサギ骨格筋のミオシンから得た。ミオシンサブフラグメント 1 (S1) は、ミオシンを鶏の胸筋より抽出し、パパイニン処理することによって得た (Margossian *et al.*, 1975)。これらのタンパク質を、液体窒素で急速凍結し、 -80°C で保存した。

キネシンマイクロチューブル系

マイクロチューブルは、チューブリン分子が重合したものである。チューブリンは牛脳より精製した。チューブリンの温度を 33°C に上げて、グリセリンと GTP を与えると重合し、逆に温度を下げると脱重合する性質を利用して粗精製を行い、さらに陰イオン交換カラムによって不純物であるマイクロチューブル結合タンパク質を取り除いた。キネシンは、キネシンの N 末 411 アミノ酸残基にそれぞれ、-Lys-Arg-Cys となるように構築された K411 の大腸菌発現プラスミドをいただいた。K411 は、Stewart らの方法 (1993) にしたがって、Glutathione S-transferase (GST) との融合タンパクとして、大腸菌で発現させた。これらの融合タンパクをグルタチオンアガロース (Sigma Co., USA) に結合させ、トロンピン (Sigma Co., USA) で特異的に GST を切断して GST のないキネシンを得た。さらに、微小管と結合させ、ATP を加えて解離させることで、活性のあるキネシンを精製した。

タンパク質の蛍光標識

アクトミオシン系

テトラメチルローダミン (Tetramethylrhodamine; TMR) によるアクチンフィラメントの蛍光標識

アクチンは、塩強度を変化させることによって、アクチンフィラメントとし、100mM CH₃CH₂COOK, 10mM HEPES pH=7.0) のバッファー中で、0.1mg/ml (2.5 μ M) のアクチンモノマーに対して、5 μ M のファロイジンテトラメチルローダミン(λ_{ex} = 543 nm, λ_{em} = 571 nm; Molecular Probes, Eugene, OR)を混合し、モル比で 1:1 で、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させることによって蛍光標識した (Harada *et al.*, 1990)。

Cy5 によるアクチンフィラメントの蛍光標識 (Funatsu *et al.*, 1995)

まず、Cy5 のアミノ基を、PEM というアダプター試薬で、チオール基感受性に変換するために、Cy5 (λ_{ex} = 648 nm, λ_{em} = 665 nm; Biological Detection Systems, USA) 1vial に、PEM 2mg を DMSO 800 μ l で溶かしたものを 3 に対して、DMSO を 4 混ぜたものを 12 μ l 入れて、恒温槽 (40 $^{\circ}$ C) で一晩反応させる。反応を停止させるには、Cy5-PEM : 1M グリシン (pH=8.2) が、モル比で 4:1 になるようにして、室温で 3 分間以上置くようにする。アクチンの蛍光標識は、Cy5-PEM-Glycine 30 μ l に G アクチン (濃度 : 1mg/ml、溶液条件 : 0.2mM CaCl₂, 0.2mM ATP, 2mM HEPES pH=7.5) 100 μ l の割合 (Cy5 とアクチンのモル比=20:1) を混ぜ、低温室で遮光、振とうして、一晩反応させておこなった。これで、アクチンの Cys374 に Cy5-PEM が蛍光標識される。反応は、最終濃度 2mM になるようにサンプル溶液に DTT を加えて停止させる。タンパクに標識されていないフリーの Cy5 は、低温室で Sephadex G-25 (NAP-5; Pharmacia, Sweden) を用い、さらにその後の透析 (透析外液 : 0.2mM CaCl₂, 0.2mM ATP, 2mM HEPES pH=7.5 / 500ml (1 回目のみ 0.5mM DTT を加える)) で除去した。最後に、塩強度を 0.1MKCl にし、ファロイジンを加えて重合させ、Cy5 アクチンフィラメントとした。

TMRによるS1の蛍光標識

S1 に存在するシステイン残基を、テトラメチルローダミンマレイミド (Molecular Probes, USA) で、モル比 1:1 で蛍光標識した (Reisler, 1982)。未反応の色素分子は Sephadex G-25 を用いて取り除いた。

Cy5によるS1の蛍光標識

S1 に存在するシステイン残基を Cy5-マレイミド (Cy5-PEM) でモル比 1:1 に蛍光標識した (Reisler, 1982)。Cy5 と PEM (Dojin, Japan) を DMSO に溶かし、40°C で一晩反応させて、Cy5-PEM を得た。未反応の色素分子は Sephadex G-25 を用いて取り除いた。

キネシンマイクロチューブル系

TMRによるキネシンの蛍光標識

K411 の C 末のシステイン残基を、テトラメチルローダミンマレイミド (Molecular Probes, USA) で蛍光標識した。

Cy5によるマイクロチューブルの蛍光標識

精製したチューブリンの一部を Cy5-PEM で蛍光標識した (ラベル率: 100-200%) (Higuchi *et al.*, 1997)。蛍光ラベルしていないチューブリンと蛍光標識したチューブリンを 20:1 の割合で混ぜ、30%グリセリン、50mM MES pH=6.7, 4mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1mM GTP で 30 分間、30°C で重合させた。微小管の脱重合を防ぐため 0.1mM Taxol を加えた。10μm 以上の長い微小管を使用したい場合には、この微小管~1μl に、チューブリンとローダミンラベルしたチューブリンを 20:1 の割合で混ぜあわせた溶液 (50mM MES pH=6.7, 4mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1mM GTP) を、30μl 加えて、30°C のままさらに 30 分伸長させた。この微小管は、0.1mM Taxol で安定化させた後、常温で保存して数週間使用した。

石英スライドの洗浄

1 分子蛍光観察の障害となるゴミやほこりを石英スライドから取り除くため、以下の順序で石英スライドを洗浄した。まず、特級アセトン中に浸し、超音波洗浄した。純水で洗浄した後、約 0.1M KOH、続いて、特級エタノール中で、超音波洗浄した。各過程の途中で純水で洗浄している。洗浄済みの石英スライドは、純水中で保存し、使用するときは、クリーンベンチ内で乾燥させた。

石英スライドのシリコンコート

洗浄済みの石英スライドを、ヘプタン中で 5% (v/v) のシグマコート (Sigma Co., USA) につけて作成した (Harada *et al.*, 1990)。

石英スライド上の金属蒸着

金属は、真空中で金属を加熱することで洗浄済みの石英スライド上に蒸着した (JEE-400, JEOL, Japan)。蒸着中の金属の膜厚は膜圧計 (JTM-200R, JEOL, Japan) でモニターした。

金属の選択

一般的に、表面プラズモン共鳴を発生させるために、金属は貴金属が用いられる。貴金属にはいくつかの利点がある (Raether, 1988)。この研究では、銀、金、アルミニウムを使用した。

- ① 化学的に安定で、化学変化を受けにくい。
- ② 光学的な性質が好ましい。すなわち、誘電率の虚数部分が小さい。
- ③ 10nm あるいはそれ以上の連続的な薄膜は、蒸着によって簡単に作るができる。
- ④ 金属のバンド構造の特徴により、バルクのプラズモンと表面プラズモンのエネルギーが近く、通常のレーザーで励起させることができる。

金属の光学定数

金属の光学定数（誘電率や屈折率）は、ハンドブックから引用した（E. Palik, 1985）。誘電率 ϵ と屈折率 n の間には、 $\epsilon = n^2$ の関係が我々の実験条件下では成り立つ。

$$n_{\text{Ag}} = 0.13 + 3.25i, \epsilon_{\text{Ag}} = -10.55 + 0.84i$$

$$n_{\text{Au}} = 0.40 + 2.54i, \epsilon_{\text{Au}} = -6.29 + 2.04i$$

$$n_{\text{Al}} = 0.91 + 6.55i, \epsilon_{\text{Al}} = -42.13 + 11.96i$$

2.5 結果

2.5.1 反射率曲線（図 10）

石英スライド上に、銀 30nm、金 20nm、アルミニウム 30nm の金属薄膜を蒸着し、532 nm の光を入射させたときの反射率の入射角依存性を測定した。表面プラズモン共鳴がおこったときは、入射した光が吸収されるので、反射率が小さくなる。反射率の減少は、表面プラズモンが発生したという 1 つの証拠である。反射率の規格化は、金属が存在していない全反射の条件の場合を反射率が 1 としておこなった。

2.5.2 表面プラズモン共鳴によるタンパク質 1 分子のイメージング

TMR-S1 のイメージング

金属薄膜表面上の TMR-S1 を観察した。用いた金属（銀 30nm、金 20nm、アルミニウム 30nm）すべてについてイメージングすることができた。光学系は従来の全反射型顕微鏡にしたがった（Funatsu *et al.*, 1995、図 11）。

蛍光像の強度と時間変化の解析は以下のようにしておこなった。ビデオに録画した蛍光像は、光ディスク（LQ-4100A, Panasonic, Japan）に複製し、イメージプロセッサー（EXCEL-2, Nippon Avionics, Japan）で、デジタル化し解析した。

S1 は、ATP 存在下でミオシンと同程度のアクチン滑り速度を実現することが

報告されている (Iwane *et al.*, 1997)。図 12(b)は、30nm のアルミニウム薄膜上での 1 分子像である (入射角は 81°、32 ビデオフレーム加算平均)。それぞれのスポットの蛍光強度は同様であり、S1 に結合している蛍光分子 1 分子を観察していると考えられる。図 12(c)は、S1 に結合した TMR の蛍光強度の 1 ビデオフレームごとの時間変化である。褪色が 1 段階でおこっている。このことは、蛍光分子 1 分子が観察できているという強い証拠である (Funastu *et al.*, 1995)。

TMR-アクチンフィラメントとそれに結合している 1 分子の Cy5-S1 の同時イメージング

さらに、この技術が 1 分子のダイナミクスや化学反応を観察するのに有用であることを示すために、1 分子の S1 とアクチンフィラメントを同時観察することを試みた。図 11 の光学系に、dual-color microscopy (Kinoshita *et al.*, 1991) を加えたものを用いた (図 13)。アクチンフィラメントに結合した 1 分子の Cy5-S1 が、 μm オーダーで離れて観察できるように、TMR アクチンフィラメントを、Cy5 で標識した S1 と標識していない S1 で 1:10 の比に混ぜ、30 分ほど待った後、希釈して金属表面上にのせて観察した (Toyoshima *et al.*, 1989)。図 14(b)は、30nm のアルミニウム上で TMR で蛍光標識したアクチンフィラメント (上) とそれに結合している Cy5 で蛍光標識した 1 分子の S1 (下) の同時観察像である。図 14(c)は Cy5 の蛍光色素 1 分子の蛍光強度の時間変化である。TMR の場合と同様、褪色は 1 段階でおこっている。

1 分子の TMR キネシンと Cy5-マイクロチューブルの同時イメージング

もう一つのモータータンパク質であるキネシンとマイクロチューブルの同時観察も試みた。方法については、2.5.3 を参照。この実験の場合も、光学系に dual-color microscopy (Kinoshita *et al.*, 1991) を含んだものを用いた (図 13)。図 16(b)、(c)は、30nm のアルミニウム上の Cy5 で蛍光標識したマイクロチューブル (b)と、その上で運動している TMR で蛍光標識した 1 分子のキネシン(c)の同時観

察像である。

2.5.3 金属表面上でのタンパク質の活性

金属表面上で、タンパク質分子の活性があるかどうかを確かめるために、アクトミオシン系 (図 15) と、キネシンマイクロチューブル系 (図 16) で、in vitro 運動再構成系を用いて調べた。

In vitro 運動再構成系

アクトミオシン系 (25°C)

方法は従来の方法にしたがった (Harada *et al.*, 1990)。塩化物イオンは銀と複合体を作り、銀が基板上からはがれるので、KCl、MgCl₂ のかわりに、CH₃CH₂COOK、MgSO₄ を用いた。0.5mg/ml のミオシン溶液 (バッファー1: 0.6M CH₃CH₂COOK, 10mM HEPES pH=7.0) を石英スライドにのせ、カバーガラス (18mm×18mm) をかぶせて、1分間待った後、50μl バッファー1 で2回スライドにつかなかったミオシンを取り除く。その後、バッファー2 (25mM CH₃CH₂COOH, 5mM MgSO₄, 20mM HEPES pH=7.8) 50 μl で2回溶液交換をし、TMR アクチンフィラメントを注入する。2~3分後、バッファー3 (バッファー2 + 2mM ATP + 脱酸素系 (4.5mg/ml グルコース, 36μg/ml カタラーゼ, 216μg/ml グルコースオキシターゼ, 0.05% 2-メルカプトエタノール)) 50 μl で2回溶液交換し、カバーガラスの端をマニキュアで固定して観察した。

キネシンマイクロチューブル系 (23°C)

2枚のスライドガラスとセロファン紙を用い、10mm×15mm×10μm のフローチャンバーをマニキュアで固定して作製した。このチャンバーに蛍光標識した微小管を流し込んで、ガラス表面に微小管がしっかり固定されるように2分間待った。表面が金属薄膜のない石英ガラスの場合は、表面をカゼイン~2mg/ml で処理した。これは、固定されなかった微小管を取り除くと共にカゼインでガ

ラス表面をコートすることによって、ビーズを石英ガラス表面に吸着しにくくするためである。その後、チャンバーに、キネシン、1mM ATP、および脱酸素系（10mM グルコース、9 μ g/ml カタラーゼ、50 μ g/ml グルコースオキシダーゼ、0.5% 2-メルカプトエタノール, Harada *et al.*,1990）を含んだバッファー（4mM MgSO₄, 0.2mM EDTA, 2mM EGTA, 10mM CH₃COOK, 10 μ M Taxol, 20mM PIPES pH=6.8）を流し込んだ。このチャンバーを、マニキュアで密封して観察した。

この実験では活性のあるタンパク質が金属表面（銀、金、アルミニウム）上で観察できるかどうかを確かめるためにおこなった。アクトミオシン系では、金、アルミニウム上では、運動活性が見出されたが、銀上では運動活性は見出されなかった（表1）。キネシンマイクロチューブル系でも同じく、金、アルミニウム上では、運動活性が見出されたが、銀上では見出されなかった（表1）。以上のことから、モータータンパクにとって、金、アルミニウムの表面は有効であるが、銀表面は不適切であることがわかった。

2.5.4 表面プラズモン共鳴によるエバネッセント場の増強

表面プラズモン共鳴によるエバネッセント場の増強は理論的に示されている。今回、TMR-アクチンフィラメントを用いて、増強の度合いを定量し、電磁気学の理論から導かれる値と比較した。

TMR-アクチンフィラメントの蛍光強度による増強度の定量

HMM（100 μ g/ml）と、TMR 標識したアクチンフィラメント（28 μ g/ml）を、25mM CH₃CH₂COOK、5mM MgSO₄、20mM HEPES pH=7.8 のバッファー中で、少なくとも30分おき、rigor 複合体を形成させ（Toyoshima *et al.*, 1989）、その溶液を上のバッファー+脱酸素系（4.5mg/ml グルコース、36 μ g/ml カタラーゼ、216 μ g/ml グルコースオキシターゼ、0.05% 2-メルカプトエタノール）で1/20に希釈し、石英スライド上にのせ、カバーガラス（18mm \times 18mm）でおおいマニキュアで封をして観察した。蛍光像は、最大入射角である81 $^{\circ}$ で、IICCDカメラ

を用いて VCR に録画した。

表面プラズモンによるエバネッセント場の増強は、TMR アクチンフィラメントの蛍光像をイメージプロセッサを使って 16 ビデオフレームの平均画像をとった定量化した。その画像の中のアクチンフィラメントのまっすぐな部分の蛍光強度を長方形に区切って計測した。バックグラウンドは、そのアクチンフィラメントのそばに、2つの正方形中の強度をとりその平均値で計算した。アクチンフィラメントの蛍光強度の比較は、計測したアクチンフィラメントの蛍光強度を、アクチンフィラメントの長さ、入射した光強度で規格化しておこなった。(入射角 81°)。銀 30nm、金 20nm、アルミニウム 30nm 上でアクチンフィラメントは観察できたが、銅 20nm 上では、脱重合し観察できなかった。理論上表面プラズモンが発生しない s 偏光の光を入射させた場合は、アクチンの蛍光強度はかなり小さくなる。このことは、蛍光分子が表面プラズモンによる電場で励起されていることを示している。

増強の度合いは、銀 30nm 上で 12.6 ± 2.6 、金 20nm 上で 1.57 ± 0.29 、アルミニウム 30nm 上で 2.33 ± 0.70 であった (表 2)。

2.6 考察

2.6.1 金属薄膜の形態の影響

金属表面の粗さの影響

金属表面の粗さは SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) を発生する。ランダムに粗い表面では、表面プラズモンによる増強の度合いは $O(1)$ である。反射率曲線の広がり、表面粗さからくる表面プラズモンの多重カップリングによるものの可能性がある。

金属薄膜の厚さの影響

非常に薄い薄膜では、高いエネルギー損失が原因で、反射率曲線にブロード

な共鳴ピークが現れる。膜厚を小さくしていくと、散乱によるバックグラウンドが増加する。10 nm 程度の蒸着膜では、まとまりのない金属のかたまりが散在する (Buckman and Kuo, 1979, Hayashi *et al.*, 1981)。バックグラウンドの増加は、入射光の島状粒子による直接の散乱によるものだと考えられる。

2.6.2 金属表面での蛍光分子 1 分子の観察：蛍光消光の影響 (図 18)

金属表面上では、多くの理論的考察から蛍光分子の劇的なライフタイムの減少と共に起こる全放射エネルギーの減少が指摘されている。いくつかの光学的な現象が、蛍光分子と金属表面の距離の関係で特徴づけられている。距離が可視光の波長の程度あるいは、それよりも大きい場合 ($d > 500\text{nm}$)、伝搬する (far-field) 発光と、その反射の干渉光が大部分を占める。中間の距離の場合 ($10\text{nm} < d < 500\text{nm}$)、双極子のエバネッセント場 (near-field) のうちの一部は、伝搬する表面プラズモンに変換され、金属のローカルな抵抗によって熱となって散逸する (i. e. 電子散乱)。距離が非常に小さい場合 ($d < 10\text{nm}$)、電子-ホールペアへのエネルギー移動が重要になり、原子スケール ($d < 0.25\text{nm}$) になると、ローカルな不均一場の効果が重大な影響を及ぼす。

金属表面近く (数 10nm 以内) の蛍光分子の蛍光消光について多くの研究が報告されている (Pockrand *et al.*, 1980, Hellen and Axelrod., 1987)。消光のメカニズムは、金属へのエネルギー移動で説明できる。しかしながら、この研究では、タンパク質分子に結合した蛍光分子 1 分子の蛍光像が、はっきりと観察できた。その蛍光強度は金属薄膜非存在下のエバネッセント場で励起した場合よりも大きかった (表 2)。我々が用いたタンパク質分子は、 $\sim 20\text{ nm}$ (S1 の大きさ)、 $\sim 7\text{ nm}$ (アクチンフィラメントの直径)、 $\sim 10\text{ nm}$ (キネシンの大きさ)、 $\sim 25\text{ nm}$ (マイクロチューブルの直径) であり、これらのタンパク質分子に結合した蛍光分子は、金属表面から完全に消光されない距離に存在していたので、1 分子の蛍光が観察できたのだと考えられる。あるいは、観察した蛍光分子がタンパク質に結合しているのか、裸の蛍光分子で存在しているときとは、周囲の環境が異なっているのかもしれない (アミノ酸や、タンパク質の屈折率についての記述。McMeekin

et al., 1963)。

2.6.3 金属表面上でのタンパク質の活性

アクトミオシン系では、金、アルミニウム上では、運動活性が見出され、滑り速度はガラス表面上や筋肉内での値と同様であり (Ishijima *et al.*, 1996)、ミオシンとアクチンがこれらの金属表面上で活性を保っていることを示している。しかし、銀上では運動活性は見出されなかった (表 1)。キネシンマイクロチューブル系でも同じく、金、アルミニウム上では、運動活性が見出され、運動速度はガラス表面上や細胞内での値と同様であった (Vale *et al.*, 1996) が、銀上では見出されなかった (表 1)。以上のことから、モータータンパクにとって、金、アルミニウムの表面は有効であるが、銀表面は不適切であることがわかった。この結果を説明する理由として、以下のようなものが考えられる。

- ・ 銀は複合体を非常に作りやすいので、タンパク質の構造を破壊している。
- ・ 金属表面上の状態 (表面電荷や疎水性など) がタンパク質の活性に影響している。

2.6.4 表面プラズモン共鳴によるエバネッセント場の増強

電磁気学の多層膜の理論との比較

表面プラズモンによる場の増幅は式(30)で与えられる。

$$T = \frac{T_{\text{metal}}}{T_{\text{no metal}}} = \frac{\left| \frac{t_{12}t_{23} \exp(ik_{z2}d_2)}{1 + r_{12}r_{23} \exp(2ik_{z2}d_2)} \right|^2}{|t_{13}|^2} \quad (30)$$

増幅の値は金属薄膜が存在するときとしないときの、Fresnel の透過係数の絶対値の 2 乗の比で与えられる。

上の式を用いて計算すると、14.3 (銀 30 nm)、5.9 (金 20 nm)、0.082 (アルミニウム 30 nm) であった (表 2)。

表 2 にあるように、銀、金上では、理論で予想される値に近い値をとったが、

アルミニウムの場合は、理論から予想される値はたったの 0.082 であった。この実験値と理論値の間のずれは、アルミニウム薄膜の光学定数が、バルクのそれと違っている可能性があることや、蛍光消光のような金属と蛍光色素の相互作用がはたらいていることが原因としてあげられる。

任意の位置での電磁場の強度

式(30)からは、金属表面上での増強度しか得られない。以下で、表面プラズモンが発生したときの任意の位置での電場の強度を計算する方法について述べる。結果を図 20 に示す。

多層膜系における電磁場の強度分布の計算法

多層膜系に光が入射したときの、電磁場強度分布を次の方法で求める。図 19 に示すような、 N 層からなる多層膜において、図のように x 軸、 y 軸、 z 軸をとる。第 n 層の誘電率を ϵ_n 、透磁率を μ_n とし、層の厚さは t_n とする。また、第 n 番目の境界の位置は d_n である（すなわち、 $t_n = d_n - d_{n-1}$ ）。この系において、光は z 軸の負の方向から、1 番目の境界面に入射角 θ_1 で入射する。このとき第 n 層の媒質中での光の伝搬方向とその媒質がなす角度 θ_n は、スネルの法則より、

$$\sqrt{\epsilon_1} \sin \theta_1 = \sqrt{\epsilon_n} \sin \theta_n \quad (37)$$

で与えられる。

第 n 層膜中の電場・磁場は、その媒質中を正の方向に伝搬する波と、負の方向に伝搬する波の和の形で表すことができる。

では、まず、 p 偏光が入射した場合について考える。 p 偏光の電場、磁場の成分は (5) 式のように表される。

$$\begin{aligned} \mathbf{E} &= (E_x, 0, E_z) \\ \mathbf{H} &= (0, H_y, 0) \end{aligned} \quad (5)$$

Maxwell の方程式より、

$$\nabla \times \mathbf{H} = \epsilon \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \quad (6)$$

である。電場の時間変化を表す項が、 $\exp(-i\omega t)$ で与えられるとき、(5)、(6)式より、

$$E_{xn} = -\frac{1}{i\omega\epsilon_n} \frac{\partial H_{yn}}{\partial z} = -i \sqrt{\frac{\mu_n}{\epsilon_n}} \frac{1}{k_n} \frac{\partial H_{yn}}{\partial z} \quad (38)$$

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (39)$$

$$k_{xn} = \sqrt{\epsilon_0} \frac{2\pi}{\lambda} \sin\theta_0 \quad (40)$$

$$k_{zn} = \sqrt{(\sqrt{\epsilon_n} k)^2 - (k_{xn})^2} \quad (41)$$

第 n 層目の各媒質中の磁場の y 成分を次のように仮定する。

$$\begin{aligned} H_{y0} &= \sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu_0}} \exp(ik_{z0}z) + B_0 \exp(-ik_{z0}z) \\ H_{y1} &= A_1 \exp(ik_{z1}z) + B_1 \exp\{-ik_{z1}(z-d_1)\} \\ &\dots\dots\dots \\ H_{yn} &= A_n \exp\{ik_{zn}(z-d_{n-1})\} + B_n \exp\{-ik_{zn}(z-d_n)\} \\ &\dots\dots\dots \\ H_{yN} &= A_N \exp\{ik_{zN}(z-d_{N-1})\} \end{aligned} \quad (42)$$

(38)式に(42)式を代入すると、電場の x 成分は、

$$\begin{aligned} E_{x0} &= \sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_0}} \frac{k_{z0}}{k_0} \left\{ \sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu_0}} \exp(ik_{z0}z) - B_0 \exp(-ik_{z0}z) \right\} \\ E_{x1} &= \sqrt{\frac{\mu_1}{\epsilon_1}} \frac{k_{z1}}{k_1} \left[A_1 \exp(ik_{z1}z) - B_1 \exp\{-ik_{z1}(z-d_1)\} \right] \\ &\dots\dots\dots \\ E_{xn} &= \sqrt{\frac{\mu_n}{\epsilon_n}} \frac{k_{zn}}{k_n} \left[A_n \exp\{ik_{zn}(z-d_{n-1})\} - B_n \exp\{-ik_{zn}(z-d_n)\} \right] \\ &\dots\dots\dots \\ E_{xN} &= \sqrt{\frac{\mu_N}{\epsilon_N}} \frac{k_{zN}}{k_N} A_N \exp\{ik_{zN}(z-d_{N-1})\} \end{aligned} \quad (43)$$

と、表せる。

ここで、第 $n-1$ 層と第 n 層との境界条件は、

$$\begin{aligned} H_{yn-1}(d_{n-1}) &= H_{yn}(d_{n-1}) \\ E_{xn-1}(d_{n-1}) &= E_{xn}(d_{n-1}) \end{aligned} \quad (44)$$

である、したがって、(42)、(43)、(44)式より、

$$\begin{aligned} &\begin{pmatrix} \exp(ik_{zn-1}t_{n-1}) \\ \sqrt{\frac{\mu_{n-1}}{\varepsilon_{n-1}} \frac{k_{zn-1}}{k_{n-1}}} \exp(ik_{zn-1}t_{n-1}) - \sqrt{\frac{\mu_{n-1}}{\varepsilon_{n-1}} \frac{k_{zn-1}}{k_{n-1}}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_{n-1} \\ B_{n-1} \end{pmatrix} = \\ &\begin{pmatrix} 1 \\ \sqrt{\frac{\mu_n}{\varepsilon_n} \frac{k_{zn}}{k_n}} - \sqrt{\frac{\mu_n}{\varepsilon_n} \frac{k_{zn}}{k_n}} \exp(ik_{zn}t_n) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_n \\ B_n \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (45)$$

となる。よって、

$$\begin{pmatrix} A_{n-1} \\ B_{n-1} \end{pmatrix} = (\alpha_{n-1})^{-1} (\beta_n) \begin{pmatrix} A_n \\ B_n \end{pmatrix} \quad (46)$$

ここで、

$$\alpha_{n-1} = \begin{pmatrix} \exp(ik_{zn-1}t_{n-1}) & 1 \\ \sqrt{\frac{\mu_{n-1}}{\varepsilon_{n-1}} \frac{k_{zn-1}}{k_{n-1}}} \exp(ik_{zn-1}t_{n-1}) & -\sqrt{\frac{\mu_{n-1}}{\varepsilon_{n-1}} \frac{k_{zn-1}}{k_{n-1}}} \end{pmatrix} \quad (47)$$

$$\beta_n = \begin{pmatrix} 1 & \exp(ik_{zn}t_n) \\ \sqrt{\frac{\mu_n}{\varepsilon_n} \frac{k_{zn}}{k_n}} - \sqrt{\frac{\mu_n}{\varepsilon_n} \frac{k_{zn}}{k_n}} \exp(ik_{zn}t_n) \end{pmatrix} \quad (48)$$

また、(42)、(43)式と、(44)式で、 $n=N, 1$ の場合より、

$$\begin{pmatrix} A_{N-1} \\ B_{N-1} \end{pmatrix} = (\alpha_{N-1})^{-1} \begin{pmatrix} A_N \\ \sqrt{\frac{\mu_N}{\varepsilon_N} \frac{k_{zN}}{k_N}} A_N \end{pmatrix} \quad (49)$$

$$\begin{pmatrix} 1 \\ B_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sqrt{\frac{\varepsilon_0}{\mu_0}} & 1 \\ \frac{k_{z0}}{k_0} - \sqrt{\frac{\mu_0}{\varepsilon_0} \frac{k_{z0}}{k_0}} \end{pmatrix}^{-1} (\beta_1) \begin{pmatrix} A_1 \\ B_1 \end{pmatrix} \quad (50)$$

(46)、(49)、(50)式から、

$$\begin{pmatrix} 1 \\ B_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu_0}} & 1 \\ \frac{k_{z0}}{k_0} & -\sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_0}} \frac{k_{z0}}{k_0} \end{pmatrix}^{-1} (\beta_1)(\alpha_1)^{-1}(\beta_2)(\alpha_2)^{-1} \cdots (\beta_{N-1})(\alpha_{N-1})^{-1} \begin{pmatrix} A_N \\ \sqrt{\frac{\mu_N}{\epsilon_N}} \frac{k_{zN}}{k_N} A_N \end{pmatrix} \quad \text{と}$$

なり、 A_n 、 B_0 が求められる。また、(5)、(6)式より、

$$E_{zn} = -\frac{1}{i\omega\epsilon_n} \frac{\partial H_{yn}}{\partial x} = i \sqrt{\frac{\mu_n}{\epsilon_n}} \frac{k_{xn}}{k_n} H_{yn} \quad (51)$$

より、電場の z 成分が求まる。

$$|\mathbf{E}|^2 = |E_{xn}|^2 + |E_{zn}|^2 \quad (52)$$

の関係より任意の場所での電場の強度が求められる

次に、s 偏光の場合について考える。s 偏光の電場、磁場の成分は、

$$\begin{aligned} \mathbf{E} &= (0, E_y, 0) \\ \mathbf{H} &= (H_x, 0, H_z) \end{aligned} \quad (53)$$

で表される。

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\mu \frac{\partial \mathbf{H}}{\partial t} \quad (54)$$

を用いて、p 偏光の場合と同様な計算を行うことにより、電場の y 成分、磁場の x 、 z 成分が求められる。

これらの計算から、s 偏光の場合も、任意の位置での電磁場の強度分布が求められる。

2.7 結論

我々は表面プラズモン顕微鏡を開発し、金属表面上で蛍光色素 1 分子のイメージングに成功した。また、表面プラズモン共鳴によって、全反射型のエバネッセント場を増強することにも成功した。この蛍光一分子イメージング技術を応用し、蛍光色素 1 分子を標識した活性のあるタンパク質 1 分子の動きを水溶液中で実時間で観察することに成功した。この技術により、表面が金属である利点を生かし、Self-Assembled Monolayer 技術 (図 21) などを用いて、タンパク質分子を金属表面上に規則的に配列させて、整列したタンパク質分子集合体を作り、その中のタンパク質 1 分子をイメージングしたりするなどして、生体分子集合体中での 1 分子の役割を解明できると考えられる。

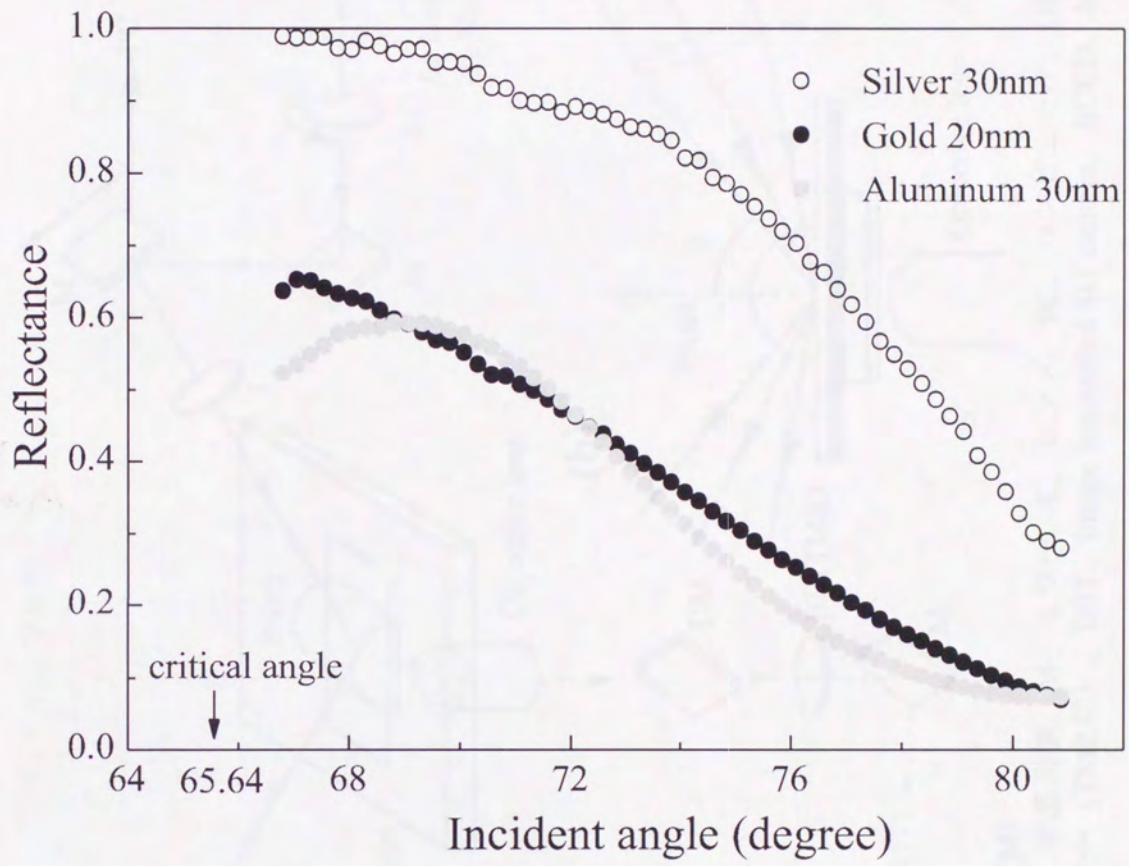


図10 表面プラズモン共鳴による反射率の角度依存性 ($\lambda=532\text{nm}$)

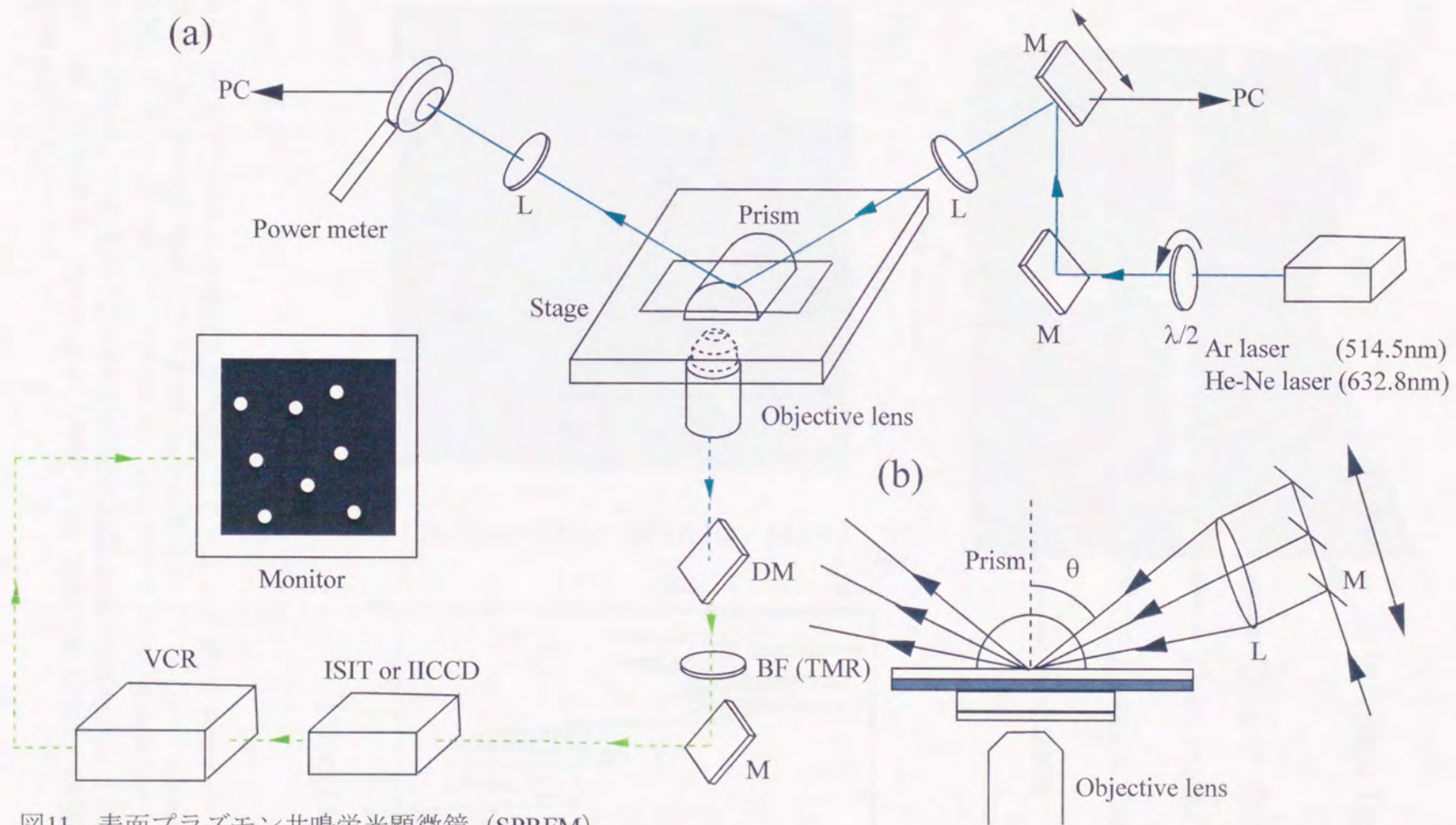


図11 表面プラズモン共鳴蛍光顕微鏡 (SPRFM)

(a)全体図。(b)入射角を変化させる方法。 $\lambda/2$ 、半波長板。M、ミラー。L、レンズ。PC、コンピュータ。DM、ダイクロイックミラー。BF (TMR)、バンドパスフィルター (TMR用)。ISIT、Image intensified SIT camera。IICCD、Image intensified CCD camera。VCR、Video cassette recorder。

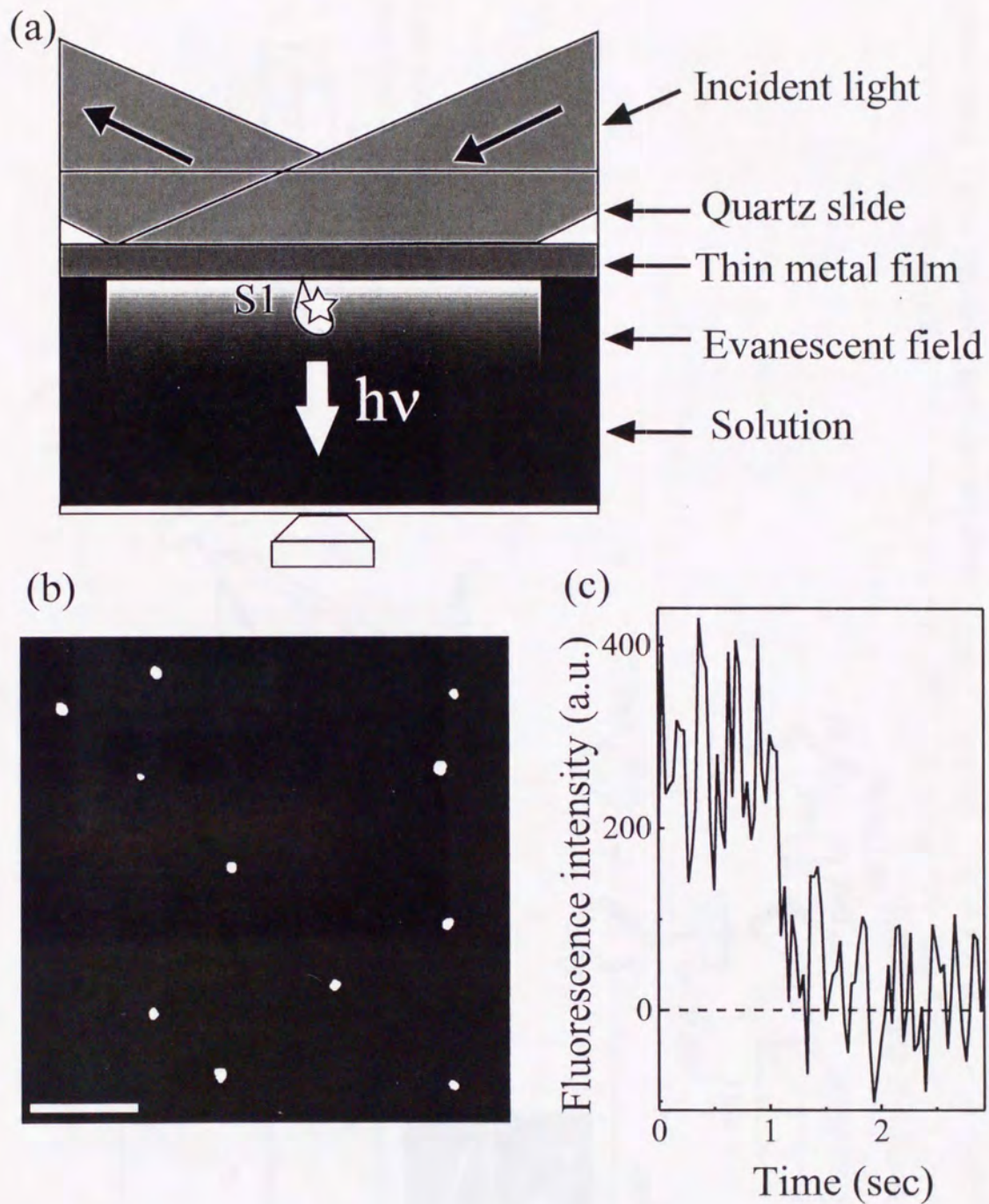
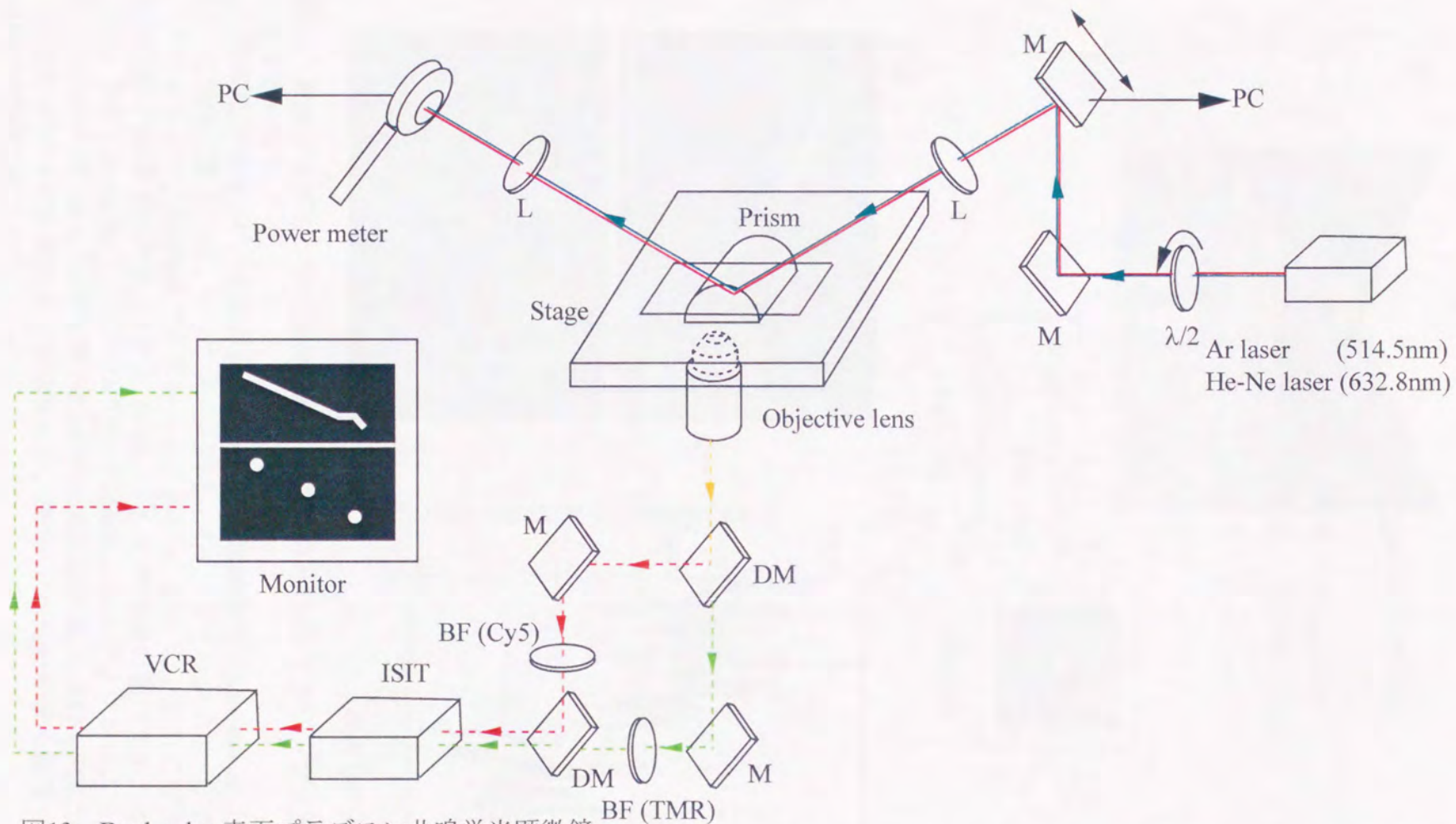


図12 表面プラズモン共鳴蛍光顕微鏡によるタンパク質1分子のイメージング
 (a) 模式図。(b) S1に標識されたTMR1分子の蛍光像(アルミニウム30nm上)。入射したArレーザーのパワーは14mW。32ビデオフレームを加算した。スケールバーは5 μm 。溶液条件: 25mM $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOK}$, 5mM MgSO_4 , 20mM HEPES pH=7.8)と脱酸素系(Harada *et al.*, 1990)。(c) TMRの蛍光強度の時間変化。褪色が1段階で起こった。



53

図13 Dual-color 表面プラズモン共鳴蛍光顕微鏡

$\lambda/2$ 、半波長板。M、ミラー。L、レンズ。PC、コンピュータ。DM、ダイクロイックミラー。BF (TMR)、バンドパスフィルター (TMR用)。BF (Cy5)、バンドパスフィルター (Cy5用)。ISIT、Image intensified SIT camera。VCR、Video cassette recorder。

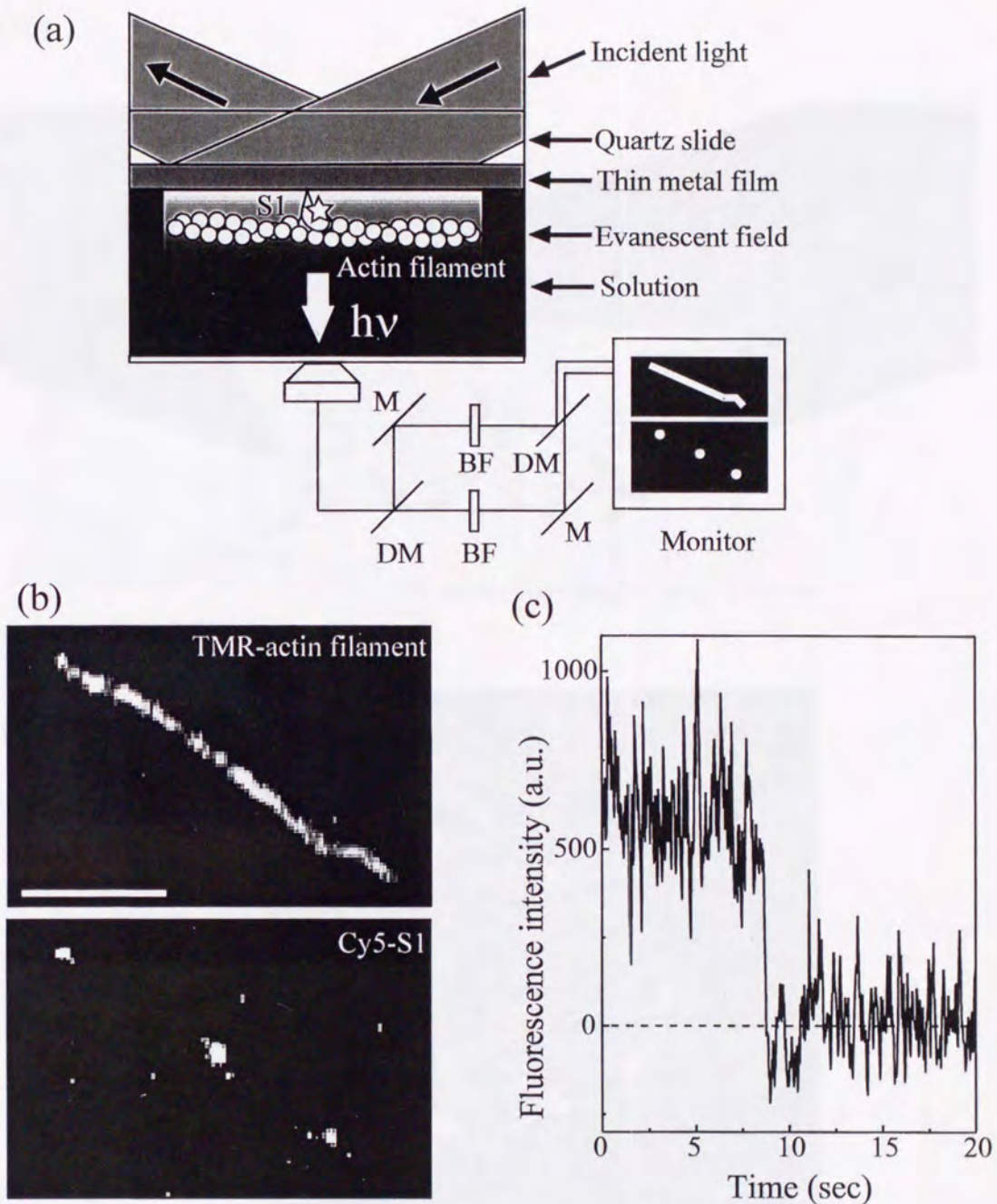
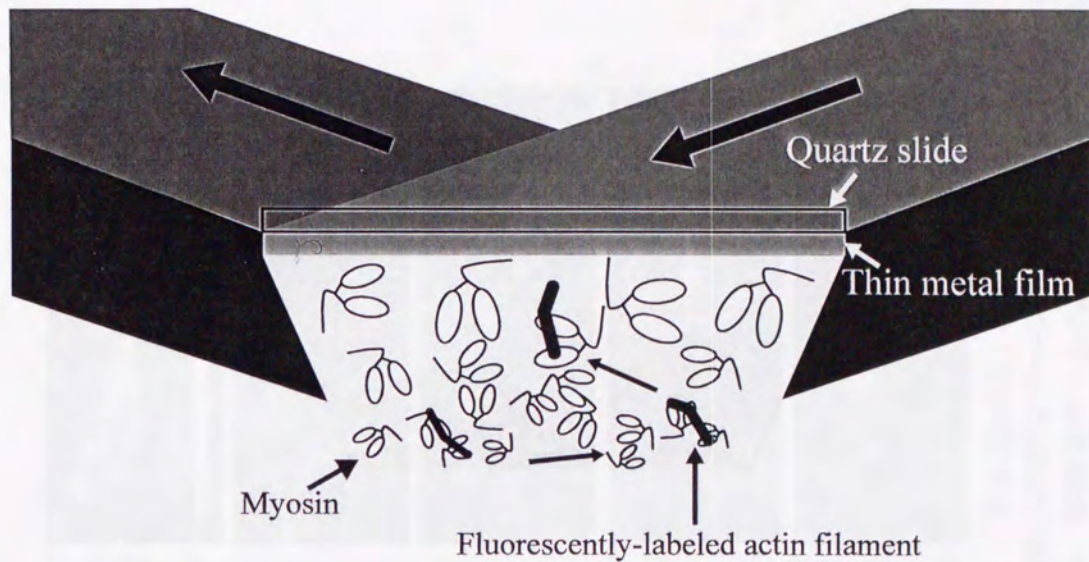


図14 表面プラズモン共鳴顕微鏡によるCy5-S1とTMR-アクチンフィラメントの同時イメージング
 (a) 模式図。TMRとCy5の蛍光像は、dual-color顕微鏡法 (Kinosita *et al.*, 1991) を用いて同時に観察した。M、ミラー。DM、ダイクロイックミラー。BF、バンドパスフィルター。(b)TMRアクチンフィラメント (上) と、それに結合している1分子のS1に標識された蛍光1分子 (Cy5、下) の同時観察像 (アルミニウム30nm上)。入射したHe-Neレーザーのパワーは6mW。16ビデオフレームを加算した。スケールバーは5 μ m。溶液条件：25mM CH₃CH₂COOK, 5mM MgSO₄, 20mM HEPES pH=7.8と脱酸素系 (Harada *et al.*, 1990)。(c)Cy5の蛍光強度の時間変化。褪色が1段階で起こった。

(a)



(b)

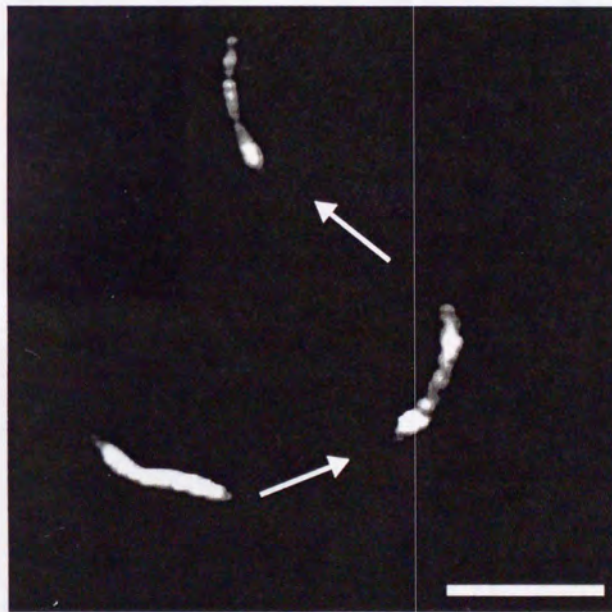


図15 アルミニウム表面上に吸着したミオシン上のTMR-アクチンフィラメントの滑り運動

(a)模式図。(b)滑り運動中のアクチンフィラメント。2秒おきに連続した蛍光像(1ビデオフレーム)を重ね合わせた。スケールバーは5 μ m。溶液条件: 25mM CH₃CH₂COOK, 5mM MgSO₄, 20mM HEPES pH=7.8と脱酸素系 (Harada *et al.*, 1990)。

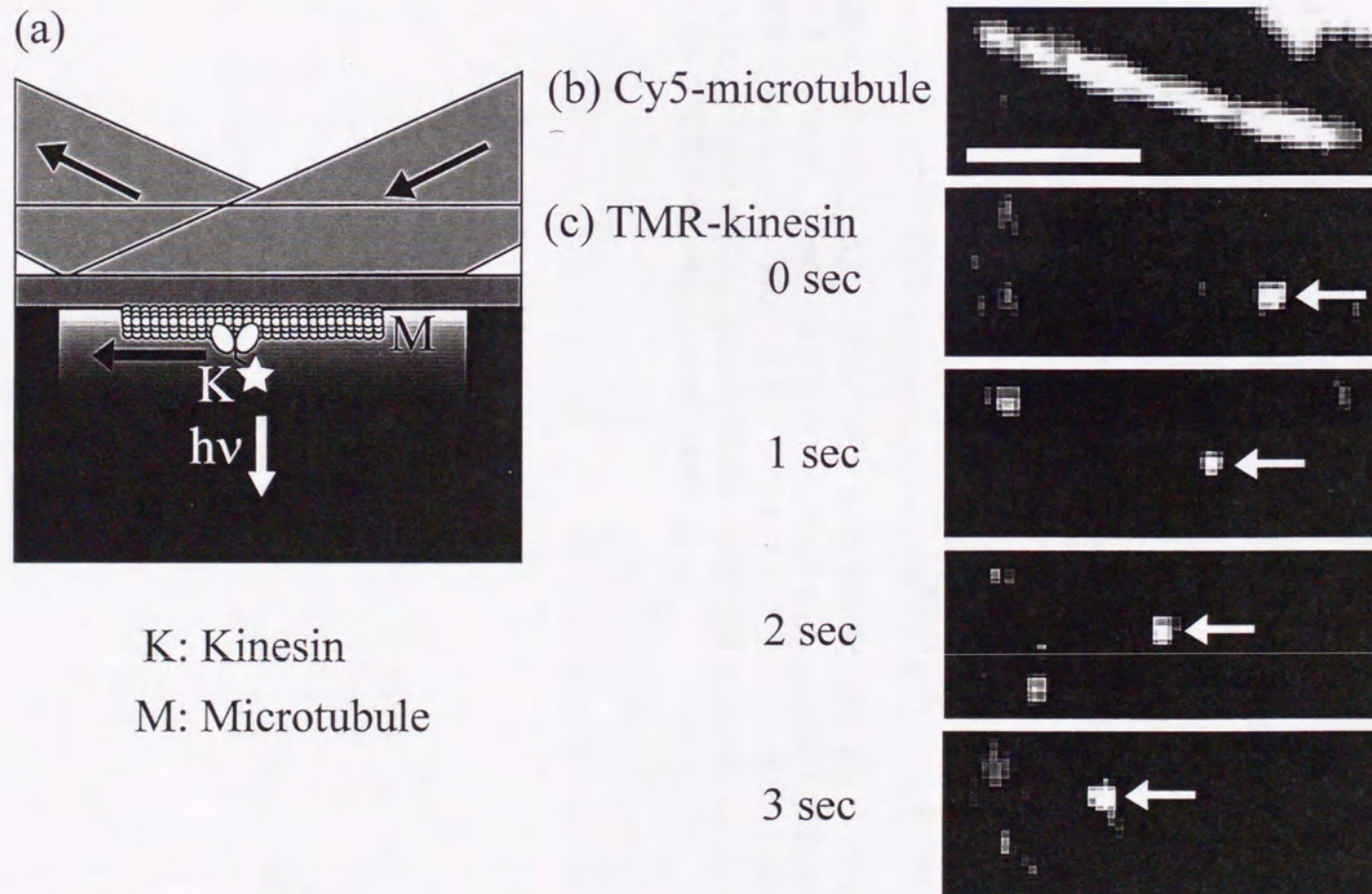


図16 TMR-キネシン1分子のCy5-マイクロチューブル上での運動 (アルミニウム30nm上)
 (a)模式図。 TMR-キネシン1分子(c)のCy5-マイクロチューブル(b)上での運動 (同時イメージング)。入射したHe-Neレーザーのパワーは6mW。16ビデオフレームを加算した。スケールバーは5 μ m。溶液条件: 1mM ATP, 20mM CH₃COOK, 4mM MgSO₄, 0.2mM EDTA, 2mM EGTA, 10 μ M Taxol, 20mM PIPES pH=6.8と脱酸素系 (Harada *et al.*, 1990)。

表1 ミオシン上でのアクチンの滑り速度 (25 °C)と、マイクロチューブル上のキネシン1分子の運動速度 (23 °C)のガラス表面上と金属表面上の比較

Surface	Velocity ($\mu\text{m/s}$)	
	Actin	Kinesin
Quartz (no metal)	3.7 ± 0.7 (30)	0.67 ± 0.10 (30)
Silver	—*	—*
Gold	2.2 ± 0.8 (19)	1.2 ± 0.4 (20)
Aluminum	4.7 ± 0.5 (35)	0.77 ± 0.16 (28)

*運動は見られなかった。値は、平均 \pm 標準偏差 (測定数)。溶液条件：アクトミオシン系は、25mM $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOK}$, 5mM MgSO_4 , 20mM HEPES pH=7.8 と脱酸素系 (Harada *et al.*, 1990)。キネシンマイクロチューブル系は、1mM ATP, 20mM CH_3COOK , 4mM MgSO_4 , 0.2mM EDTA, 2mM EGTA, 10 μM Taxol, 20mM PIPES pH= 6.8 と脱酸素系 (Harada *et al.*, 1990)。

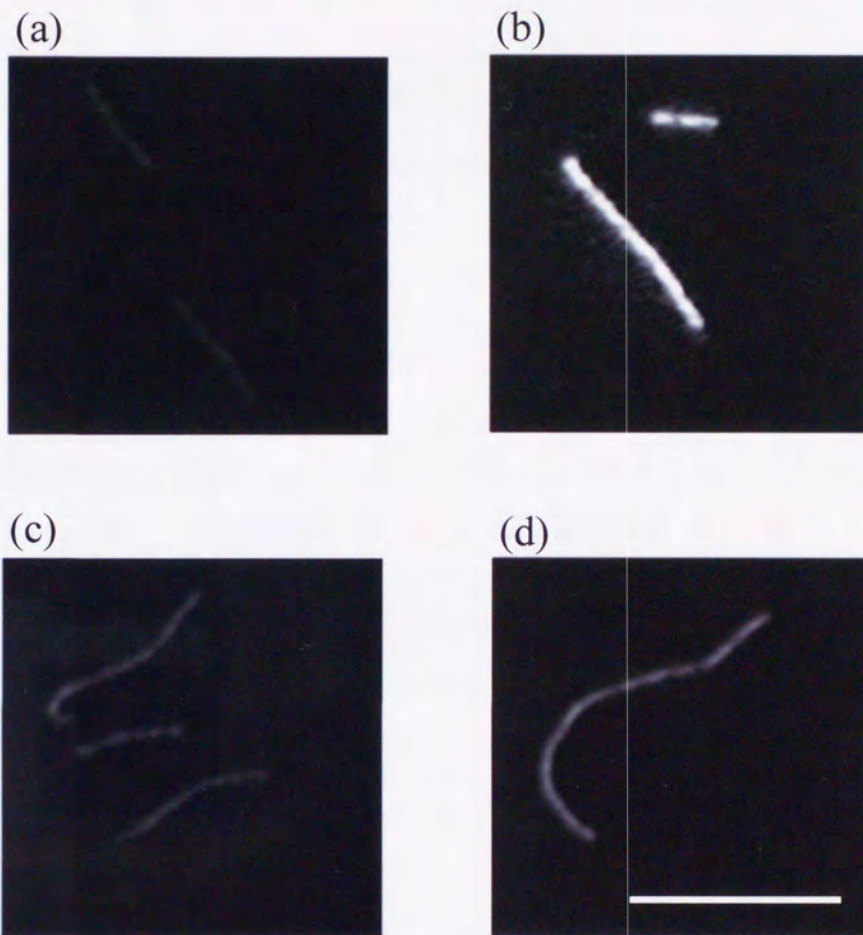


図17 TIRによる石英スライド上(a)と、SPRによる種々の金属表面上 ((b)銀30nm、(c)金20nm、(d)アルミニウム30nm) でのTMR-アクチンフィラメントのIICCDでの観察。蛍光強度は、入射光強度がすべて同じになるように規格化してある。溶液条件：25mM $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOK}$, 5mM MgSO_4 , 20mM HEPES pH=7.8と脱酸素系 (Harada *et al.*, 1990)。

表2 金属表面での TMR アクチンフィラメントの蛍光強度の比較(実験と理論)

Surface	Experiment	Theory
Quartz (no metal)	1.00±0.26 (86)	1
Silver 30nm	12.6 ±2.6 (64)	14
Gold 20nm	1.57±0.29 (37)	5.9
Aluminum 30nm	2.33±0.70 (52)	0.082

蛍光強度は Quartz (no metal) 上での蛍光強度で規格化してある。値は、平均 ± 標準偏差 (測定数)。溶液条件: 25mM CH₃CH₂COOK, 5mM MgSO₄, 20mM HEPES pH=7.8 と脱酸素系 (Harada *et al.*, 1990)。

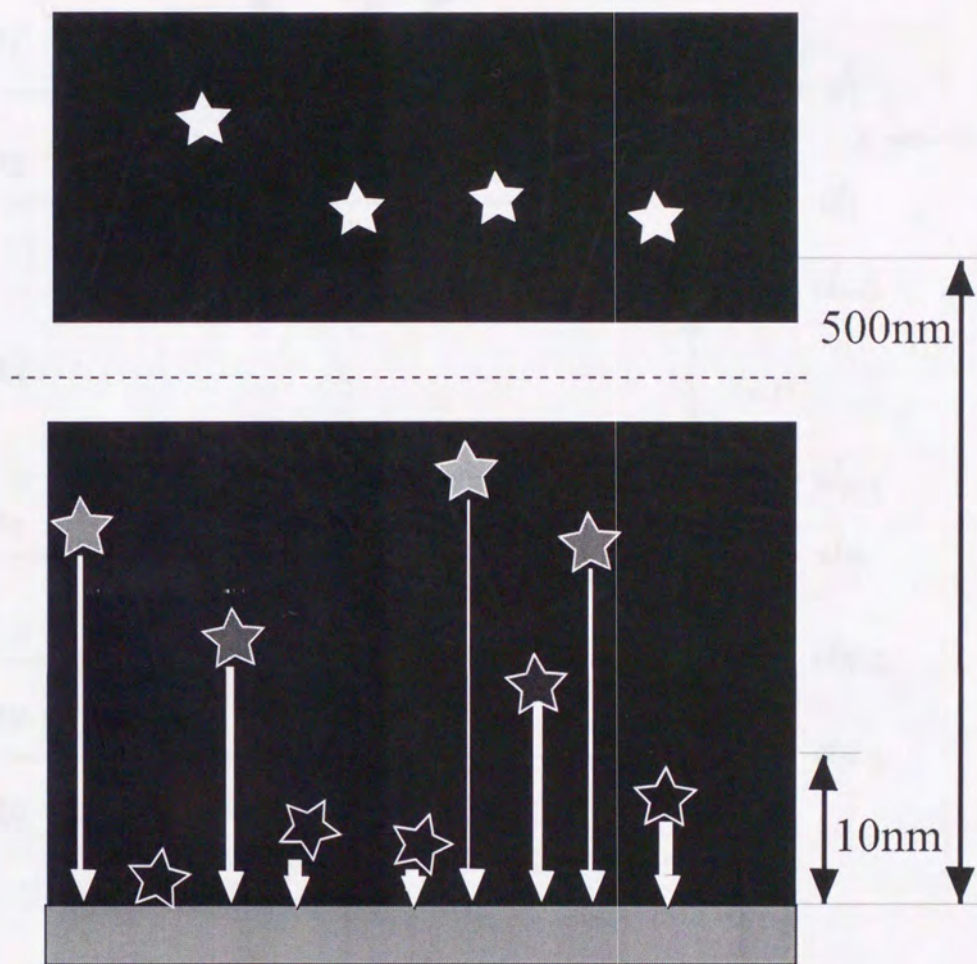


図18 蛍光消光の概念図

蛍光色素は、金属表面からの距離によって、発光のエネルギーがエネルギー移動によって金属に吸収されるため消光される。理論的考察より、距離が10nm以下の場合には蛍光は完全に消光されると考えられている。消光の影響は、距離が500nmの程度まで存在すると考えられている。

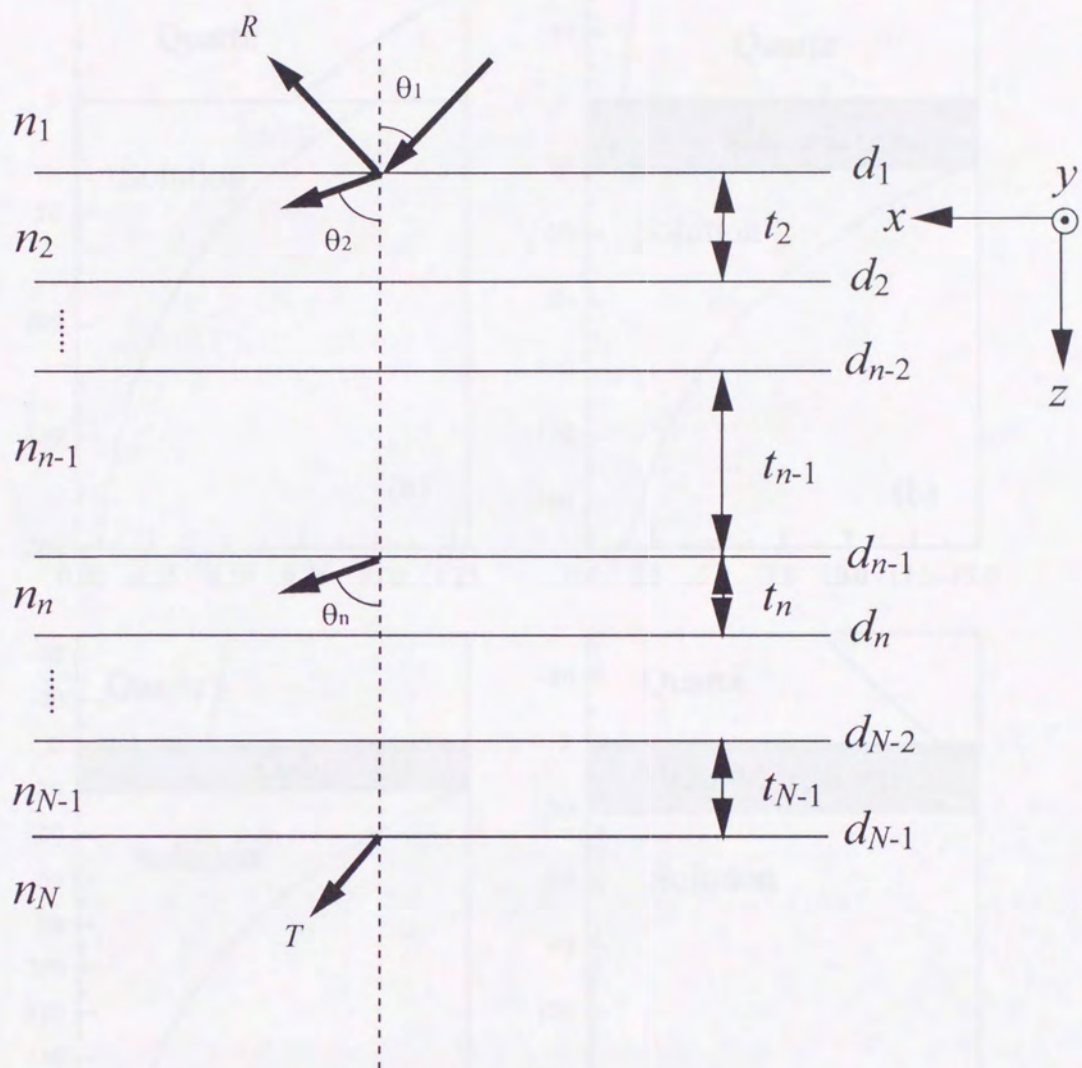


図19 多層膜の電磁場強度を計算するモデル系

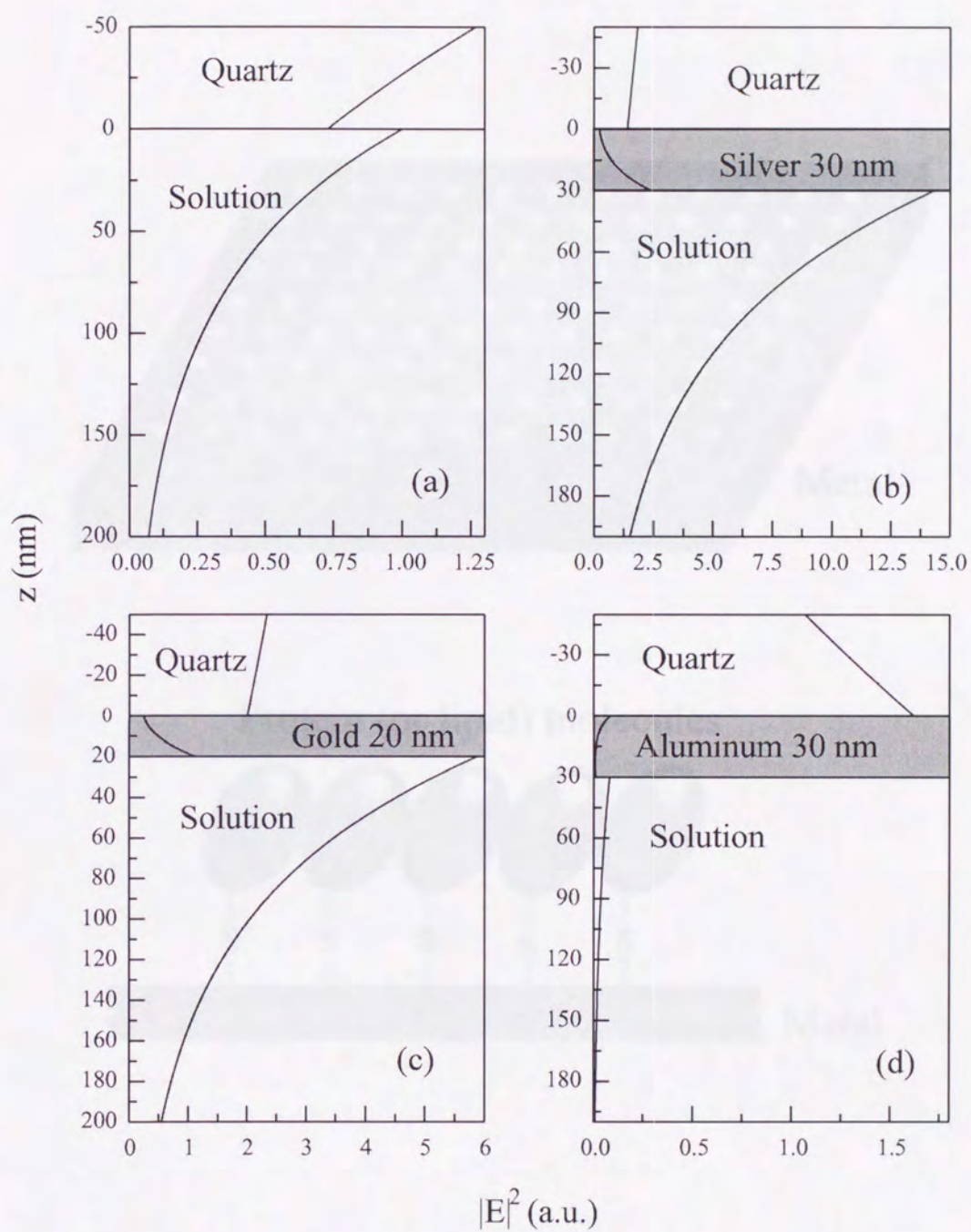
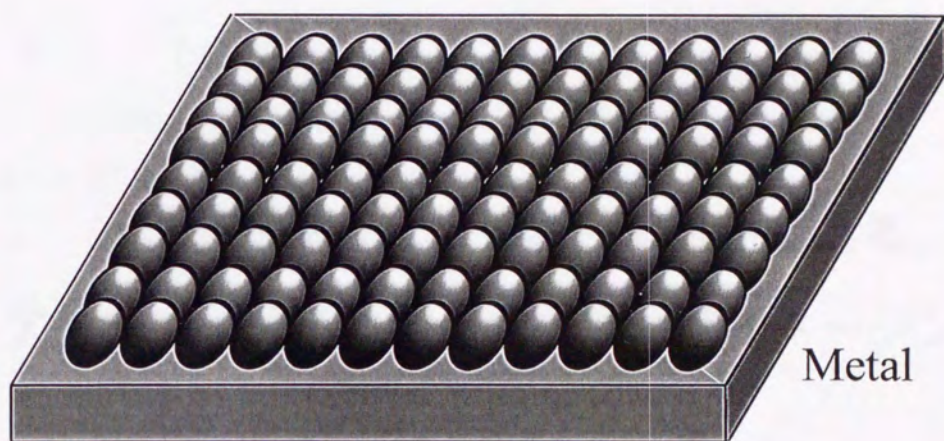


図20 理論から導かれる電場強度の比較
 金属がないTIRの場合の、石英-溶液境界面の電場強度を1として規格化した。
 (a)金属がない場合。(b)銀30nm。(c)金20nm。(d)アルミニウム30nm



Protein (or lipid) molecules

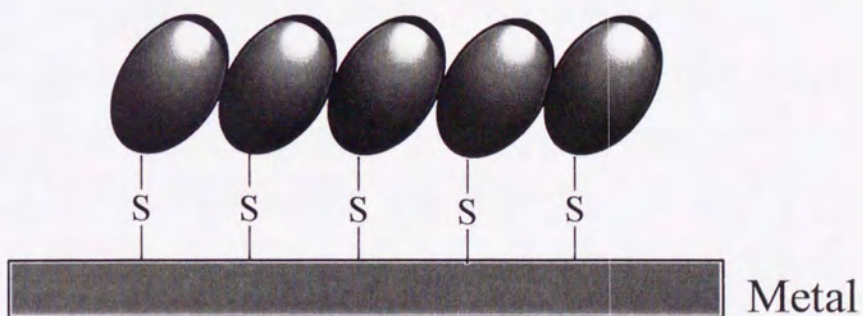


図21 Self-assembled monolayerの概念図
SH基と金属間の共有結合によって、タンパク質分子や脂質分子が秩序よく金属表面上に整列する。

3. 1 分子蛍光エネルギー移動法によるアクチン 1 分子の構造変化実時間イメージング

3.1 目的

この研究の目的は、蛍光 1 分子イメージング技術をもとに、タンパク質 1 分子内の構造の変化を実時間で直接観察することである。

この目的を達成するために、蛍光エネルギー移動という現象 (Förster, 1948) を利用した。この現象は、蛍光分子 (ドナー) の励起エネルギーの一部が、蛍光として放出されずに近くにいる別の蛍光分子 (アクセプター) を励起しアクセプターも蛍光を発するという現象である (図 22)。ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルに重なりがある場合に起こる (図 23)。ドナー、アクセプターの蛍光強度を測定し、エネルギー移動効率を調べることで、2 つの蛍光分子の相対的空間配置 (距離と方向) について知見を与える。具体的には、アクチン分子内にドナー、アクセプター色素を導入し、船津らが開発した 1 分子蛍光エネルギー移動顕微鏡 (和沢, 1997) を用いて、それら 1 分子の蛍光強度を同時にモニターするか、あるいは分光をおこなった。

すでに、上記の顕微鏡を用いた系で、サブユニット (TnI-TnC) 間では、蛍光エネルギー移動効率が秒オーダーのゆっくりした変化をすることが示された。このことは、サブユニット間で遅い構造のゆらぎがあるらしいことを示唆するものである。(Ishii *et al.* 1997)。GFP は、蛍光を発するタンパク質であるが、1 分子の蛍光を観測すると、秒オーダーで蛍光強度が変化し、遅いコンフォメーションゆらぎがあるらしい (Dickson *et al.*, 1997)。タンパク質のコンフォメーションは、唯一ではなくいくつもあり、その間をいたりきたりしていると考えられる。タンパク質の機能はその 3 次元構造に大きく依存している。一般的に、タンパク質の構造は、Anfinsen のモデル: 「アミノ酸配列に従って自発的に折りたたまれ自由エネルギー最小値のところで安定化されている。」と考えられている (Anfinsen, 1973)。一方、タンパク質の構造の柔軟性をとりいれ、タンパク質は自由エネルギー最小値に非常に近い値をもつ準安定な極小構造を多

数もち、熱エネルギーによってそれらの極小構造間をゆらいでいるという考え方もされるようになってきた (Frauenfelder *et al.*, 1991)。この構造のゆらぎがタンパク質の機能に重要であると思われる。たとえば、筋収縮をおこなうアクチンミオシン系では、エネルギー源である化学物質 ATP の熱ゆらぎ ($\sim k_B T$) とあまり大きさの変わらない比較的小さい入力化学エネルギーを力学エネルギーに変換する。従来のアボガドロ数のオーダーの分子の平均値では、この構造のゆらぎは測定できない。

この研究の目的は、アクチンを例にとり、すでに構築した 1 分子蛍光エネルギー移動分光顕微鏡で、動的なタンパク質 1 分子内の構造のゆらぎの有無を測定し、ダイナミックなタンパク質の構造のゆらぎと機能の関係にせまることである。

3.2 蛍光励起エネルギー移動 (FRET)

蛍光分子 (ドナー) の励起エネルギーが、すべて蛍光として放出されずに近くにいる別の蛍光分子 (アクセプター) を励起する現象 (図 22)。ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルに重なりがある場合に起こる (図 23)。エネルギー移動効率を調べることで、2 つの蛍光分子の相対的空間配置 (距離と方向) について知見を与える。エネルギー移動効率は以下の式で与えられる (Förster, 1948)。

$$E = 1 - \frac{I_{ET}}{I_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (55)$$

R_0 (Förster 距離) は、エネルギー移動効率が 50% になるドナー-アクセプター間の距離で、以下の式で表される。

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D J}{128\pi^5 n^4 N_A} \quad (56)$$

R が大きくなると、エネルギー移動効率は減少し、小さくなると増大する。図 24 に TMRCD と Cy5 の場合 ($R_0=5.6\text{nm}$) の、蛍光色素間距離とエネルギー移動効率の関係を示した。エネルギー移動効率の変化は、 $R = R_0$ 近傍で急激であり、

ドナー-アクセプター間の距離が、 Förster 距離よりもかなり大きい場合、小さい場合は緩やかである。この理論式は、 R が 1 ~ 10 nm の範囲でしか成り立たないことは注意すべきである。以下に、パラメーターの説明を加えておく。

$$J = \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda : \text{重なり積分} \quad (57)$$

λ : 波長

$\epsilon_A(\lambda)$: アクセプターのモル消光係数

$f_D(\lambda)$: 波長スケールで規格化したドナーの発光スペクトル

$$f_D(\lambda) = \frac{F_{D\lambda}(\lambda)}{\int_0^{\infty} F_{D\lambda}(\lambda) d\lambda} \quad (58)$$

$F_D(\lambda)$: 波長単位あたりのドナーの蛍光スケールで規格化した蛍光スペクトル

κ : 方向ファクター (図 25)

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D \cos\theta_A)^2 \quad (59)$$

θ_T : ドナーの発光モーメントとアクセプターの吸収モーメント間の角度

θ_D : ドナーの発光モーメントとドナーとアクセプターを結んだ直線間の角度

θ_A : アクセプターの吸収モーメントとドナーとアクセプターを結んだ直線間の角度

ドナー、アクセプターともに等方的に高速で回転している場合は、

$$\kappa^2 = \frac{2}{3} \quad (60)$$

である。

- ・ ドナーとアクセプターの距離が大きいとき



エネルギー移動は起こらない

- ・ ドナーとアクセプターの距離が小さいとき



エネルギー移動が起こる

図22 蛍光エネルギー移動の概念図

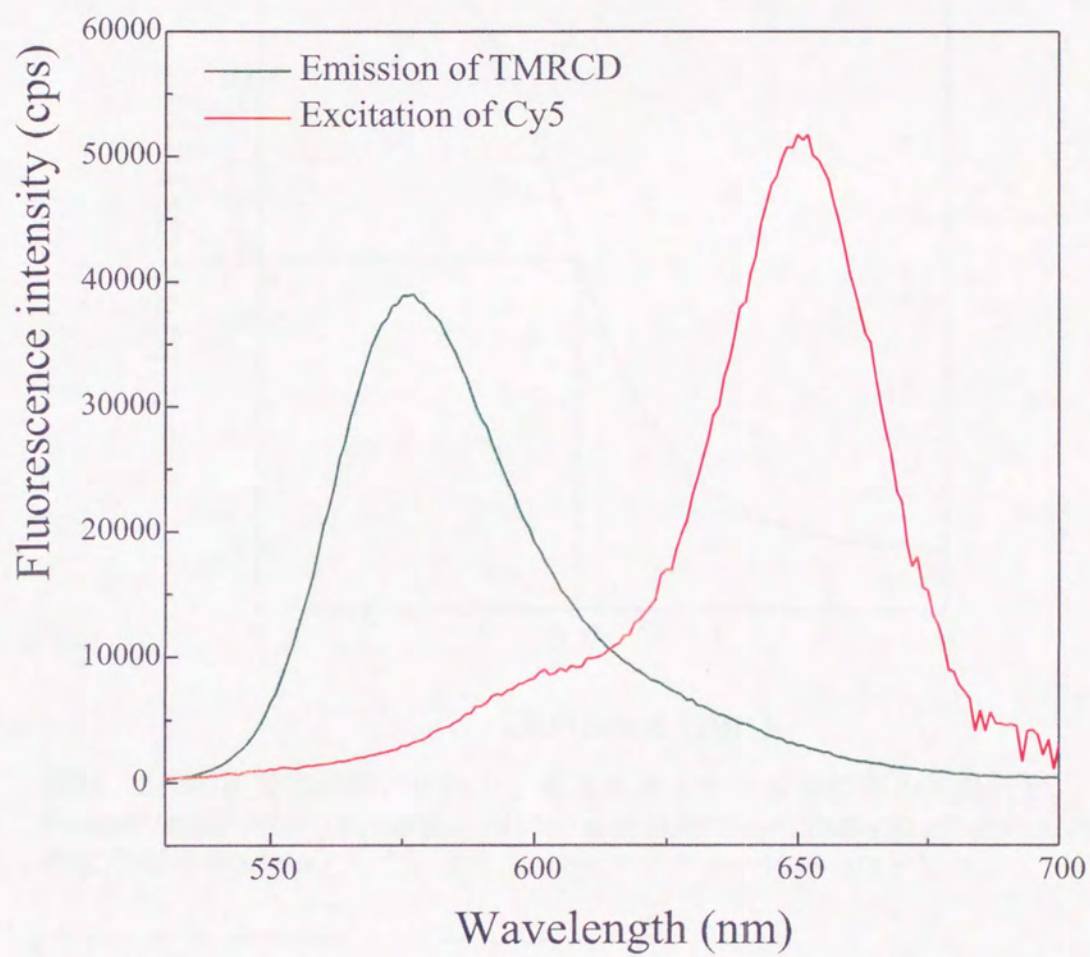


図23 TMRCDの発光スペクトルとCy5の励起スペクトル

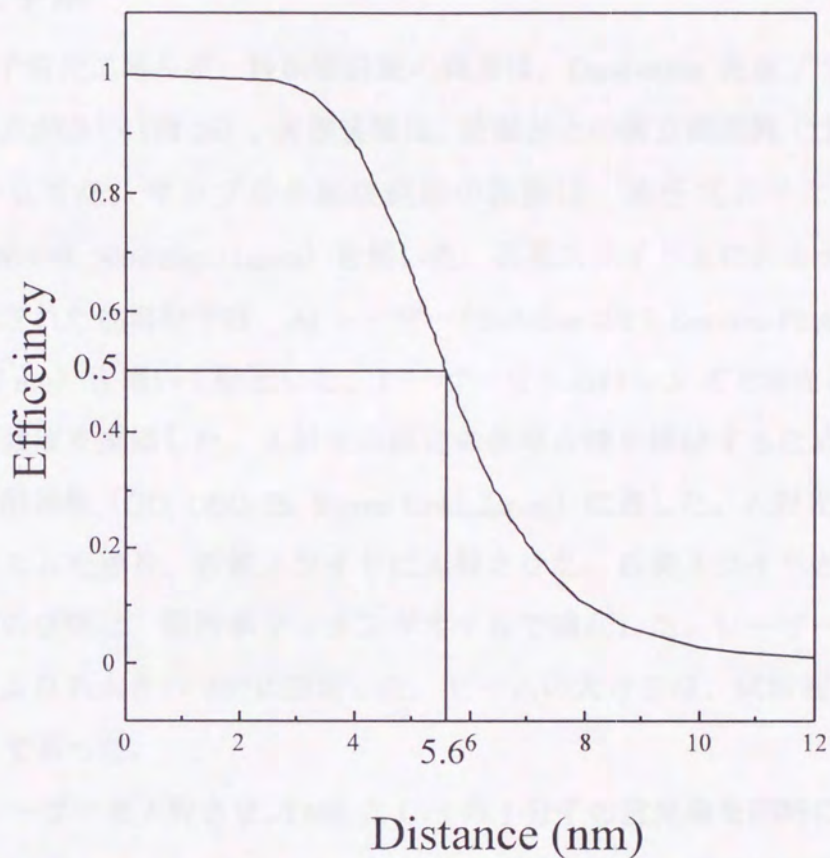


図24 2つの蛍光色素間の距離と、蛍光エネルギー移動効率の理論計算。
 Forsterの距離 (R_0) は、実験に用いた蛍光色素であるTMRCDとCy5の組み合わせの場合の5.6nmとした。また、方向ファクターは $\kappa^2=2/3$ とした。

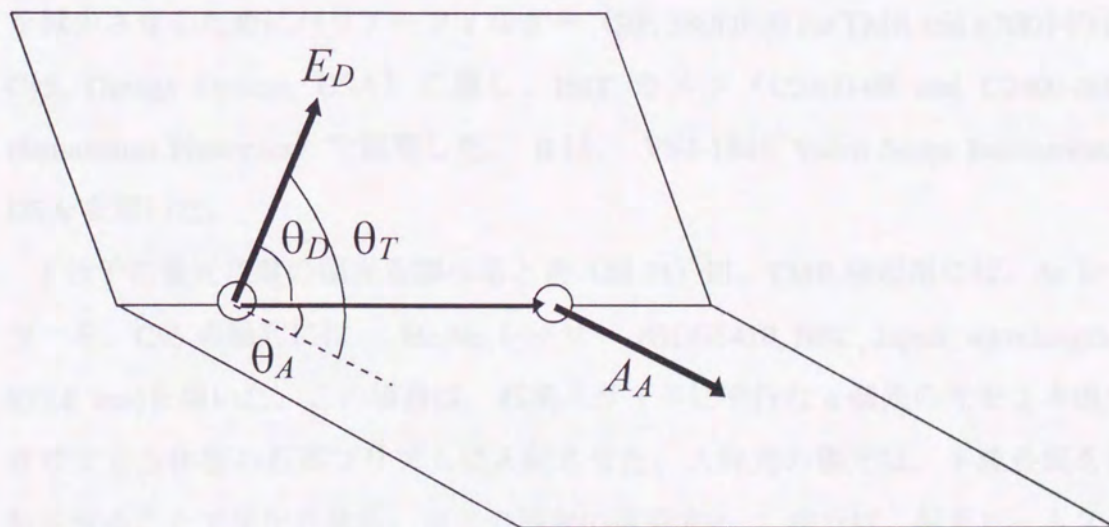


図25 蛍光エネルギー移動効率を計算する際の方角ファクターの説明図

3.3 光学系

1 分子蛍光エネルギー移動顕微鏡の概要は、Dual-color 表面プラズモン顕微鏡と共通点が多い(図 26)。実験装置は、防振台上の倒立顕微鏡(TMD300, Nikon)に組み立てた。サンプルの観察範囲の移動は、水圧式のマニピュレーター(MHW-103, Narishige, Japan)を用いた。石英スライド上にあるタンパク質に蛍光標識された色素分子は、Ar レーザー(Stabilite 2017, Spectra-Physics, wavelength = 514.5 nm)を用いて励起した。レーザービームはレンズで集光し、ND フィルターで強度を調節した。入射光の偏光の非等方性を排除するため、入射光は石英偏光解消板(QD; DEQ-2S, Sigma Koki, Japan)に通した。入射光は、60°分散石英プリズムを通り、石英スライドに入射させた。石英スライドと、石英プリズムの間の空間は、屈折率マッチングオイルで満たした。レーザーの入射角は、臨界角よりも大きい 69°に固定した。ビームの大きさは、試料面で約 100 μm × 300 μm であった。

Ar レーザーを入射させ、TMR と Cy5 の 1 分子の蛍光像を同時に見るために、dual-color microscopy (Kinoshita *et al.*, 1991)を用いた。蛍光は対物レンズ(NCF PlanApo × 60; NA = 1.4; Nikon, Japan)で集光し、二色の蛍光を分離するために、ダイクロイックミラー(特注品, Sigma Koki)に通した。分離した蛍光は背景光を減少させるためにバリアーフィルター(BF, 580DF30 for TMR and 670DF40 for Cy5, Omega Optical, USA)に通し、ISIT カメラ(C2400-08 and C2400-80H, Hamamatsu Photonics)で観察した。II は、VS4-1845, Video Scope International, USA を用いた。

1 分子の蛍光色素の偏光を調べるとき(図 31)は、TMR 励起用には、Ar レーザーを、Cy5 の励起には、He-Ne レーザー(GLG5410, NEC, Japan, wavelength = 632.8 nm)を用いた。この場合は、石英スライドに平行な s 偏光の光を 2 本直交させて立方体型の石英プリズムに入射させた。入射光の偏光は、半波長板を回転させることで変化させた。蛍光の偏光の直交する 2 成分は、偏光ビームスプリッターを、上記のダイクロイックミラーの代わりに取り付け、蛍光像の蛍光強度として同時に観察した。

1 分子の蛍光を分光する場合 (図 26;和沢、1997) は、ミラーによって光路を切り替え、蛍光はレンズで集光され、励起光の散乱によるバックグラウンドを減少させるために、ノッチフィルター(NF; HNPF-514.5-1.0, Kaiser Optical Systems, USA) を通り、ピンホール (PH; 直径 150 μm ; 04-PPM-016, Melles Griot, USA) に共役な位置 (1.5 μm ×1.5 μm) に焦点を結ぶようにした。蛍光は回折ポリクロメーター (600 本/mm; 13.3 nm/mm; M10-TP, Spectral Instruments, Japan) に入り、分光され、一次元のマルチチャンネルの冷却 CCD カメラ (256×1024 pixels, MPP, back illumination; CCD15-11-0219, Wright Instruments, UK) に投影されるので、波長スペクトルは波長のスキャンをすることなく一度にとれた。冷却 CCD の波長分散のキャリブレーションには、スペクトルキャリブレーションランプ (6034 (Hg-Ne) , Oriel, USA) を用いた。

溶液系の蛍光を分光する場合は、蛍光分光光度計 (Fluorolog, SPEX, USA) を用いた。

3.4 材料

タンパク質の調製

アクトミオシン系

すでに 2.4 で述べた。ミオシンは、ウサギの骨格筋から得たものを用いた。

タンパク質の蛍光標識

アクチンの蛍光 2 重標識

アクチン 1 分子内の 2 つのアミノ酸残基 (Cys374、Gln41) に、それぞれ Cy5 と TMRCDC (Tetramethylrhodamine-cadaverine) を蛍光標識した。蛍光標識の順序はどちらが先でもよいが、Cy5、TMRCDC の順にした。

Cy5 によるアクチンの蛍光標識

すでに、2.4 で述べた。

TMRCDC によるアクチンの蛍光標識

アクチンの Gln41 を、トランスグルタミナーゼの酵素反応を用いて、TMR で蛍光標識した (Takashi, 1988)。ダンシルカダベリンは、トランスグルタミナーゼの仲介を受けて Gln に結合する。

まず、TMRCDC (Tetramethylrhodamine cadaverine, $\lambda_{ex} = 544 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 571 \text{ nm}$; Molecular Probes, USA) を G アクチン (μM のオーダー) に対して、モル比にして 5 倍量入れる。酵素であるトランスグルタミナーゼを加えて、低温室で振とうし一晩反応させる。反応物溶液に、KCl の最終濃度が 0.1M になるように KCl を加え、室温で 2 時間静置し G アクチンを重合させ、F アクチンとする。その後、100,000/rpm、10 分、4°C の超遠心機 (TL100) にかけて、蛍光標識された F アクチン (沈殿) と、トランスグルタミナーゼ (上清) に分ける。F アクチンを G バッファー (0.5mM ATP, 0.2mM CaCl₂, 20mM HEPES pH = 7.8) に溶かし、G アクチンとした後、G バッファーで 3 回透析する。

2 重蛍光標識 G アクチンと無標識 G アクチンの共重合

蛍光 1 分子イメージングが可能ないように、まばらに 2 重蛍光標識アクチンを存在させるため、無標識のアクチンと共重合 (~1:100) させ、アクチンフィラメントとした。

3.5 結果

3.5.1 TMRCDC, Cy5 二重蛍光標識アクチン 1 分子の FRET 分光スペクトル

溶液 (図 28(a))、1 分子 (図 28(b)) とともに、TMRCDC と Cy5 のピークが見られた。このことは、アクチン 1 分子で FRET がおこっていることを示している。

3.5.2 TMRCDCy5 二重蛍光標識アクチン 1 分子の実時間 1 分子 FRET イメージング

蛍光 1 分子イメージングが可能のように、まばらに 2 重蛍光標識アクチンを存在させるため、無標識のアクチンと共重合 (~1:100) させ、アクチンフィラメントとしたものを、ミオシンで石英ガラス基板上に rigor の状態で固定した。アクチンフィラメント中の TMRCDCy5 を、エバネッセント光を用いて励起し (図 27)、アクチン 1 分子内の 2 つのアミノ酸残基間の位置関係を、蛍光エネルギー移動 (FRET) 法を用いて、TMRCDCy5 の蛍光強度を定量することで、実時間イメージングした。蛍光像の強度と時間変化の解析は以下のようにしておこなった。ビデオに録画した蛍光像は、光ディスク (LQ-4100A, Panasonic, Japan) に複製し、イメージプロセッサ (EXCEL-2, Nippon Avionics, Japan) で、デジタル化し解析した。

3.5.3 1 分子 FRET を用いた蛍光色素間の距離の導出方法

蛍光強度が比較的安定している図 29 の場合を例にとって考える。この場合は 1 分子のドナー-アクセプター間で、最初の数秒間、蛍光エネルギー移動が見られた。その後、アクセプターが褪色し次いでドナーが褪色した。 $I_{ET} = 134$ 、 $I_0 = 518$ となるので、

$$E = 1 - \frac{I_{ET}}{I_0} = 1 - \frac{134}{518} = 0.74 \quad \text{となる。}$$

$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$ の関係式より R を求めると ($R_0 = 5.6\text{nm}$, $\kappa^2 = 2/3$ を適用)、 $R = 4.7\text{nm}$ となる。

3.5.4 TMRCDCy5 二重蛍光標識アクチン 1 分子の FRET 効率のゆらぎ

Dual-color microscopy を用い、アクチンフィラメント中のアクチン 1 分子の TMRC1 分子と Cy5 分子の蛍光像をビデオに録画して、画像解析装置で解析した。図 30 が 2 つの蛍光色素の蛍光強度の時間変化である。ドナーである TMRC1 の蛍光強度の増加（減少）にともなって、Cy5 の蛍光強度の減少（増加）が見られる。2 つの蛍光色素間で、エネルギー移動が起こっているという 1 つの証拠である。蛍光強度の変化が、秒オーダーでおこっており、アクチン 1 分子内で遅い構造のゆらぎが起こっている可能性を示唆している。

3.5.5 TMRC1-アクチン、Cy5-アクチン 1 分子の偏光実時間イメージング

TMRC1 アクチンと Cy5 アクチンそれぞれの場合について、1 分子蛍光偏光顕微鏡を用いて、アクチンに標識されている蛍光色素の配向の時間変化を調べた。図 32 にあるように、蛍光の互いに直交する Horizontal な成分の蛍光強度と Vertical な成分の蛍光強度を同時に測定した。TMRC1、Cy5 いずれの場合も、Horizontal な成分と Vertical な成分の蛍光強度がほぼ同じ時間変化をし、1 分子の色素の配向は、秒オーダーでは変化していないようである。

3.6 考察

3.6.1 FRET 効率の理論式（Förster の式）を、1 分子 FRET に適用する場合の問題点

FRET 効率の理論式は次式で与えられる。

$$E = 1 - \frac{I_{ET}}{I_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (55)$$

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D J}{128\pi^5 n^4 N_A} \quad (56)$$

Förster 距離 R_0 の中には、よくわかっていないパラメーターがいくつかある。

1) κ^2 : 方向ファクター

この値は、ドナーの発光ダイポールとアクセプターの吸収ダイポールの相対的な向きによって決まる。これまでのなされてきた仮定は、 $\kappa^2 = 2/3$ というものである。この仮定は、ドナー、アクセプターがどちらも高速で制限なくランダムに回転しているときのみ成り立つ。この仮定を満足するのは、蛍光分子が小さく、高速で歳差運動をする分子に限られる。アミノ酸残基に共有結合でつなぎとめられた蛍光分子を考えると、制限のない回転運動を想像するのは難しい。理論的には、 κ^2 は 0 から 4 の値をとりうる。最小値である 0 と最大値である 4 は、色素の向きが高度に偏っていなければならないので、実際にはありそうにない。

Dale ら (1979) は、ドナーとアクセプターの偏光度と κ^2 の値を関連づけた。その値から κ^2 の最大値と最小値をもとめた。しかし、 R_0 のなかに不確かさが残った。

Stryer と Haugland (1967) は、この問題に合成ポリプロピレンオリゴペプチドを用いた。FRET 効率が、蛍光色素間の距離の 6 乗に反比例する関係が確認され、その距離は X 線回折の構造とも一致した。どうやら、 $\kappa^2 = 2/3$ という仮定は、小さいタンパクについてのみ成り立つようである。

この方向ファクターの不確実性を克服するために、1 分子 FRET では Dual-dual microscopy (図 33) が有効ではないかと考えた。ドナー 1 分子とアクセプター 1 分子の蛍光強度のみならず、色素の向きも同時に見ようというものである。

2) Q_D : ドナーの量子効率

1 分子 FRET が起こっているときに、ドナーの量子効率が変わると、ドナーの蛍光強度が変わるほか、アクセプターの蛍光強度もその分だけ変わると期待されるので問題はないと考えられる。

3) $J \left(= \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \right)$: 重なり積分

($f_D(\lambda)$):は波長スケールで規格化したドナーの発光スペクトル)

ドナーの発光スペクトルが変化すると、FRET 効率も変化する。蛍光色素 1 分子の発光スペクトルの変化については既に報告されている (Lu and Xie, 1997)。Dual-color microscopy では、ドナーとアクセプターの蛍光強度をモニターしているだけなので、ドナーの発光スペクトルの変化は追うことができない。この問題点を克服するためには、時間分解能をあげて、1 分子蛍光分光を行わなければならない。TMR のスペクトルが割合は少ないが変化することがある。

4) $\epsilon_A(\lambda)$: アクセプターのモル消光係数

このパラメーターが変化すると、FRET 効率が変わるので、見かけ上ドナーとアクセプターの位置関係が、実際とは異なり変化しているように見える。色素の蛍光のオン、オフの現象はブリンキングと呼ばれている。蛍光を発するタンパク質である GFP で報告されている (Dickson *et al.*, 1997)。アクセプターがブリンキングしているかどうかを見るために、ドナー-アクセプターの蛍光と、アクセプターのみを交互にみる方法を考えた (図 34)。アクセプターがブリンキングしていないときには、アクセプターのみを励起したときに、アクセプターの蛍光強度は通常の 1 分子の蛍光強度となるが、ブリンキングした場合には、アクセプターが消えていたり、あるいは暗かたりすることが予想される。

3.6.2 アクチンの構造

X 線構造回折

1990 年に 2.8Å 分解能の G アクチンの原子構造 (Kabsch *et al.*, 1990) が提出された。F アクチンの構造は、この G アクチンの構造をもとに推定された (Holmes *et al.*, 1990, 1993., Kabsch *et al.*, 1990)。また、ミオシンと相互作用中の構造も提出されている (Rayment *et al.*, 1993, Schroder *et al.*, 1993)。しかし、これらのデータはすべて莫大な分子数の平均であり、実際におこっているであろうタンパ

ク質の構造のゆらぎに関しては、情報を与えてくれない。

FRET

アクチンのあらゆるアミノ酸残基に蛍光標識が可能なることから、FRET 分光法によって溶液中の構造の情報がたくさん得られている (Miki *et al.*, 1992, Moens *et al.*, 1994, dos Remedios and Moens, 1995, Kim *et al.*, 1995, Moraczewska *et al.*, 1996, Moens and dos Remedios, 1997)。FRET から得られたデータのほとんどは、Cys10 を蛍光標識したものを除いては、この構造とよく一致している。方向ファクターはすべて $2/3$ と仮定している。こちらの場合も、条件は天然に近いが、溶液系や X 線構造解析の場合と同じく、すべて莫大な分子数の平均であり、実際におこっているであろうタンパク質の構造のゆらぎに関しては、情報を与えてくれない。

Gln41-Cys374 間の距離

溶液系の FRET のデータから、Gln41-Cys374 間の距離は 2.5nm (Miki *et al.*, 1992) であった。この距離は、アクチンの原子モデルから得られた値 (4.1nm) よりかなり小さい。1 分子の測定で FRET 効率がゆらがない場合 (図 29)、蛍光色素間の距離を計算してみると、4.7nm であった。この値は、原子モデルから得られた値に近い。X 線回折から得られたデータとの違いは、Gln41 が Pro38 と Ser52 のやわらかいと考えられているループの中に存在しているのが 1 つの原因であると考えられる。

アクチン 1 分子内のゆっくりした構造のゆらぎ

エネルギー移動効率の変化を、すべて距離の変化に換算すると、1nm 以上の大きな構造変化が秒オーダーのゆっくりした時間スケールでおこっていることになる。アクセプターのプリンキングや、色素の配向の寄与でこのような現象が起きているのかもしれない。

プリンキングの寄与を見るために、図 34 のような実験系を考えた。エネルギー

一移動中の、ドナー蛍光色素とアクセプター蛍光色素を交互に励起し、エネルギー移動中にアクセプター色素の蛍光が完全の形であれば、プリンキングは存在せず、1分子 FRET はタンパク質の何らかの構造変化を反映していると考えられる (図 34(a))。これとは逆にエネルギー移動中にアクセプター色素の蛍光が完全の形でなければ、プリンキングが存在し、1分子 FRET はタンパク質の構造変化を反映していないと考えられる (図 34(b))。

このアクチンの構造のゆらぎが真実のものであったとすると、タンパク質のコンフォメーションは、唯一ではなくいくつかあり、その間をいったりきたりしていると考えられる。一般的に、タンパク質の構造は、Anfinsen のモデル:「アミノ酸配列に従って自発的に折りたたまれ自由エネルギー最小値のところで安定化されている。」と考えられている (Anfinsen, 1973)。一方、タンパク質の構造の柔軟性をとりいれ、タンパク質は自由エネルギー最小値に非常に近い値をもつ準安定な極小構造を多数もち、熱エネルギーによってそれらの極小構造間をゆらいでいるという考え方もされるようになってきた (Frauenfelder *et al.*, 1991)。G タンパクの中には、構造多型があることも報告されている (Ito *et al.*, 1997)。このアクチン 1 分子の構造のゆらぎが、エネルギー源である化学物質 ATP の熱ゆらぎ ($\sim k_B T$) とあまり大きさの変わらない比較的小さい入力化学エネルギーを力学エネルギーに変換するのに重要な役割をはたしているのかもしれない。

3.7 結論

蛍光 1 分子イメージング技術を発展させ、タンパク質 1 分子（アクチン）内に、ドナー蛍光色素 1 分子とアクセプター蛍光色素 1 分子を標識し、その間の FRET を分光、あるいは実時間イメージングすることに成功した。その結果、FRET 効率が秒オーダーでゆらぎ、アクチン 1 分子内の構造が遅くゆらいでいるらしいデータが得られた。この構造のゆらぎがタンパクの機能に重要な役割を果たしているに違いない。この結果が、本当にアクチンの構造変化を反映しているのかについては、さらに詳細な実験が必要である。

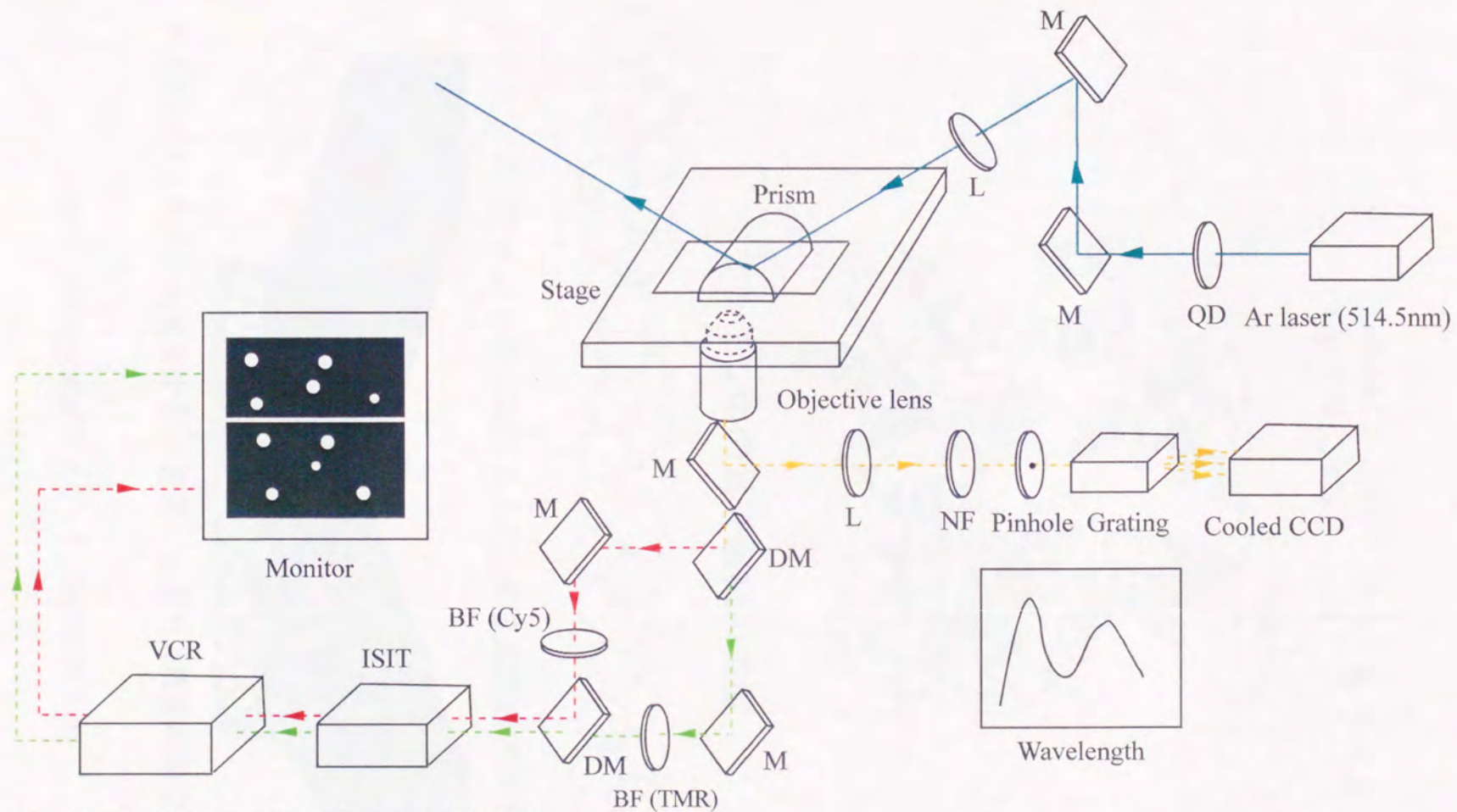
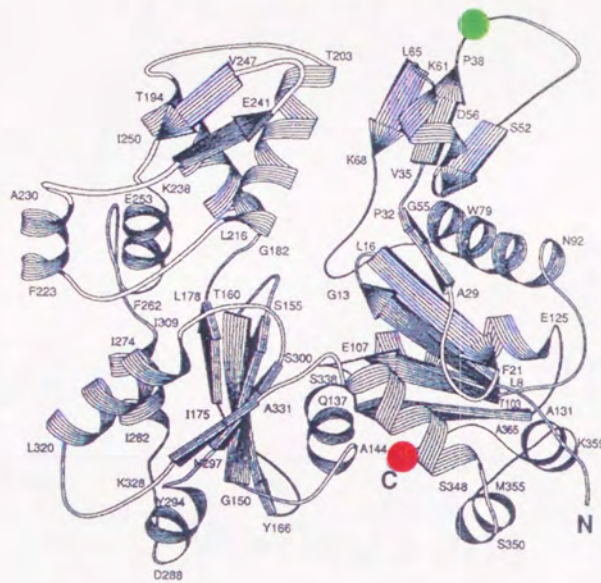


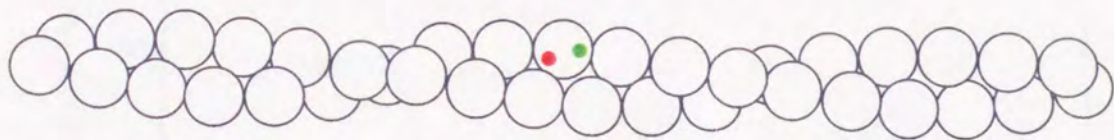
図26 1分子蛍光エネルギー移動一分光顕微鏡

QD、石英ディフューザー。M、ミラー。L、レンズ。NF、ノッチフィルター。DM、ダイクロイックミラー。BF (TMR)、バンドパスフィルター (TMR用)。BF (Cy5)、バンドパスフィルター (Cy5用)。ISIT、Image intensified SIT camera。VCR、Video cassette recorder。

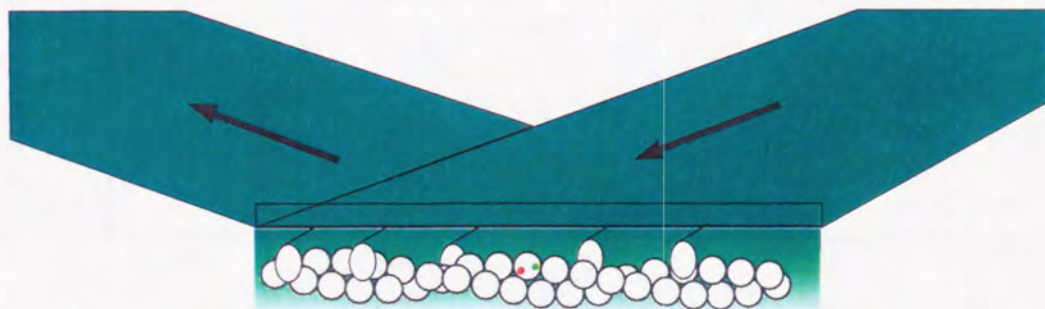
Gln41に TMRCD } をラベル
 Cys374に Cy5



アクチン中の蛍光標識の位置



アクチンフィラメント中に取り込んだ2重蛍光標識アクチン1分子



アクチンフィラメントをミオシンを通してガラス表面に固定して観察

図27 2重蛍光標識アクチン1分子の観察方法

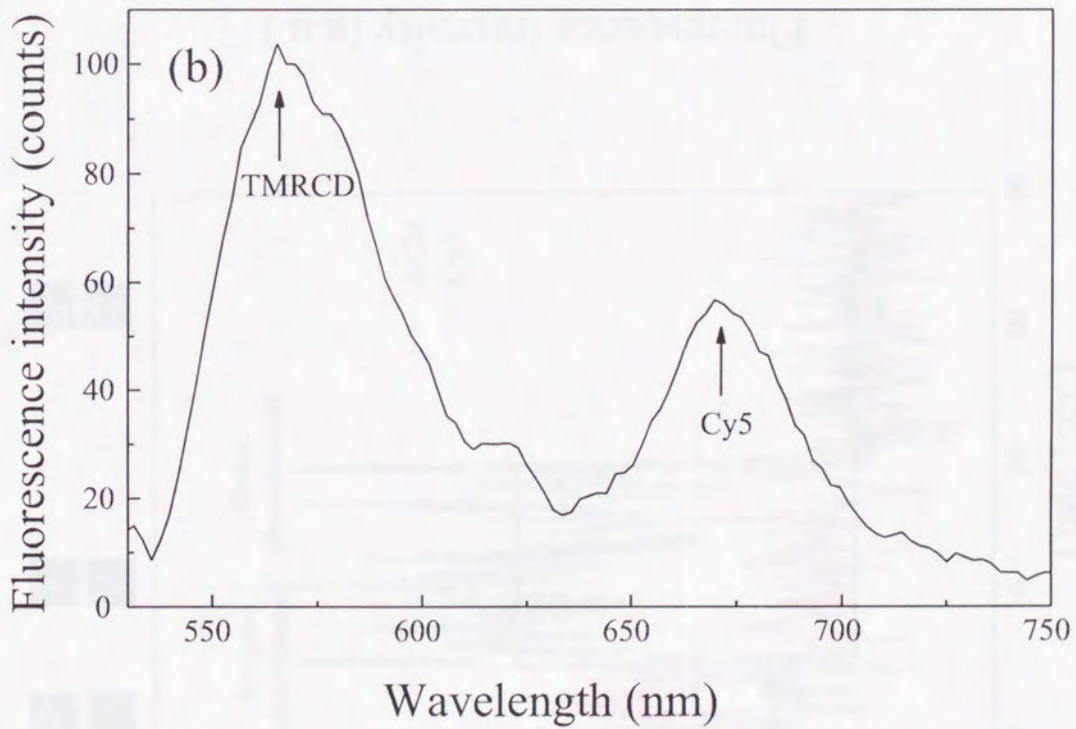
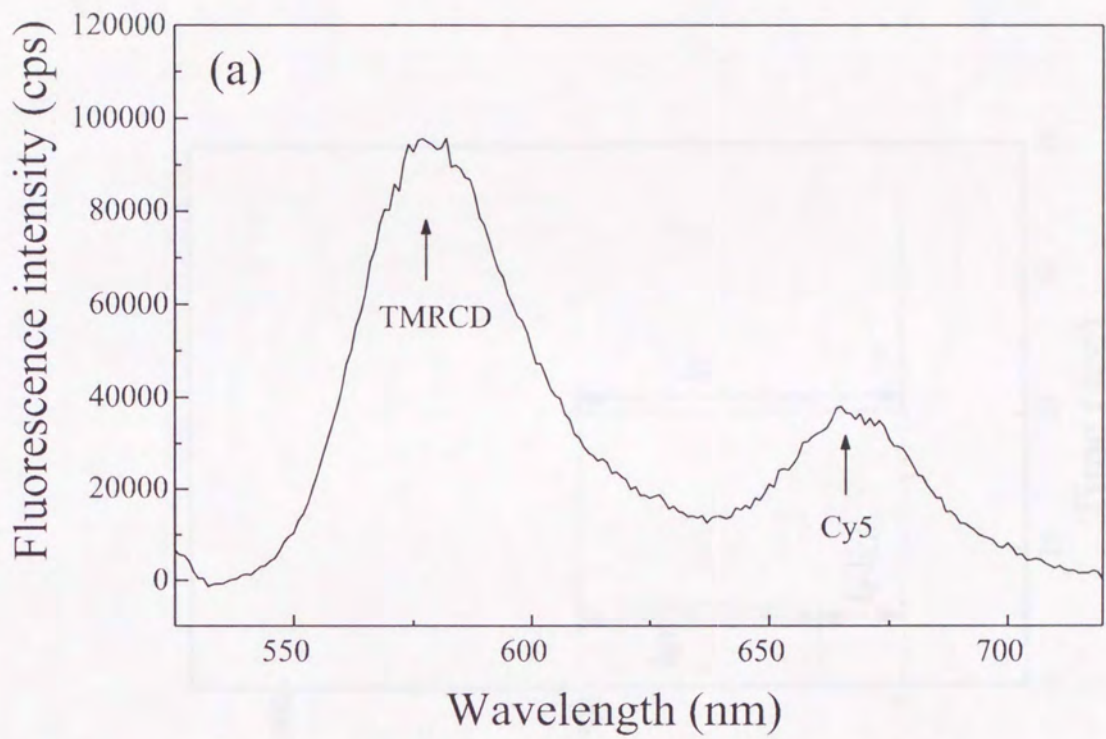


図28 TMRCd,Cy5-2重蛍光標識アクチンのFRET分光スペクトル
(a)溶液系。(b)1分子系。

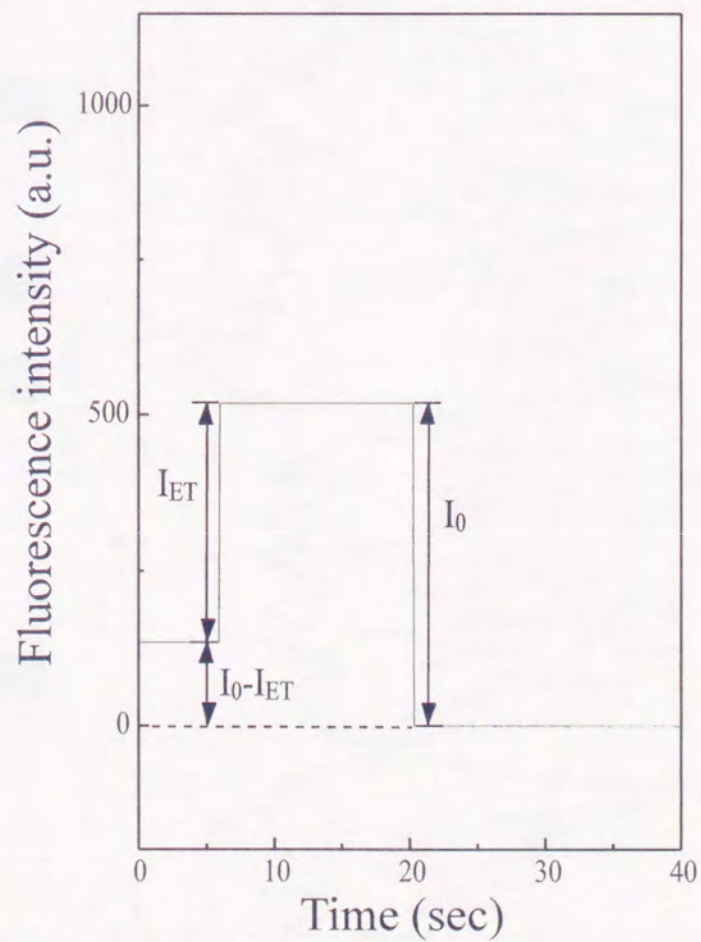
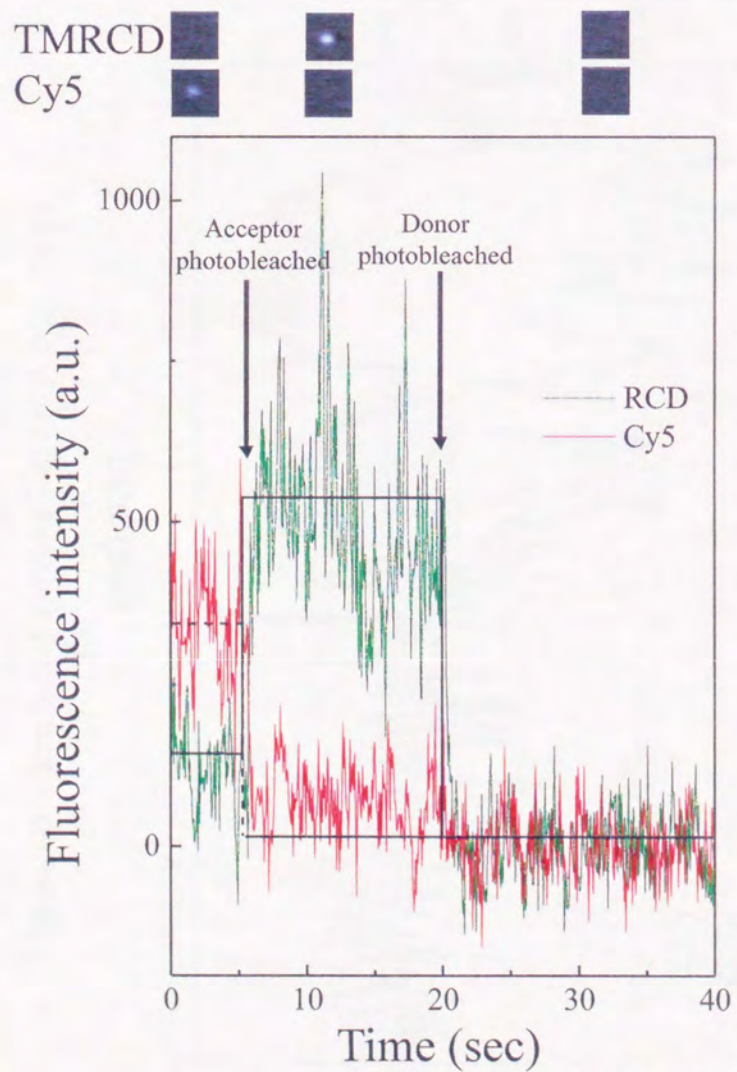


図29 1分子蛍光エネルギー移動の説明

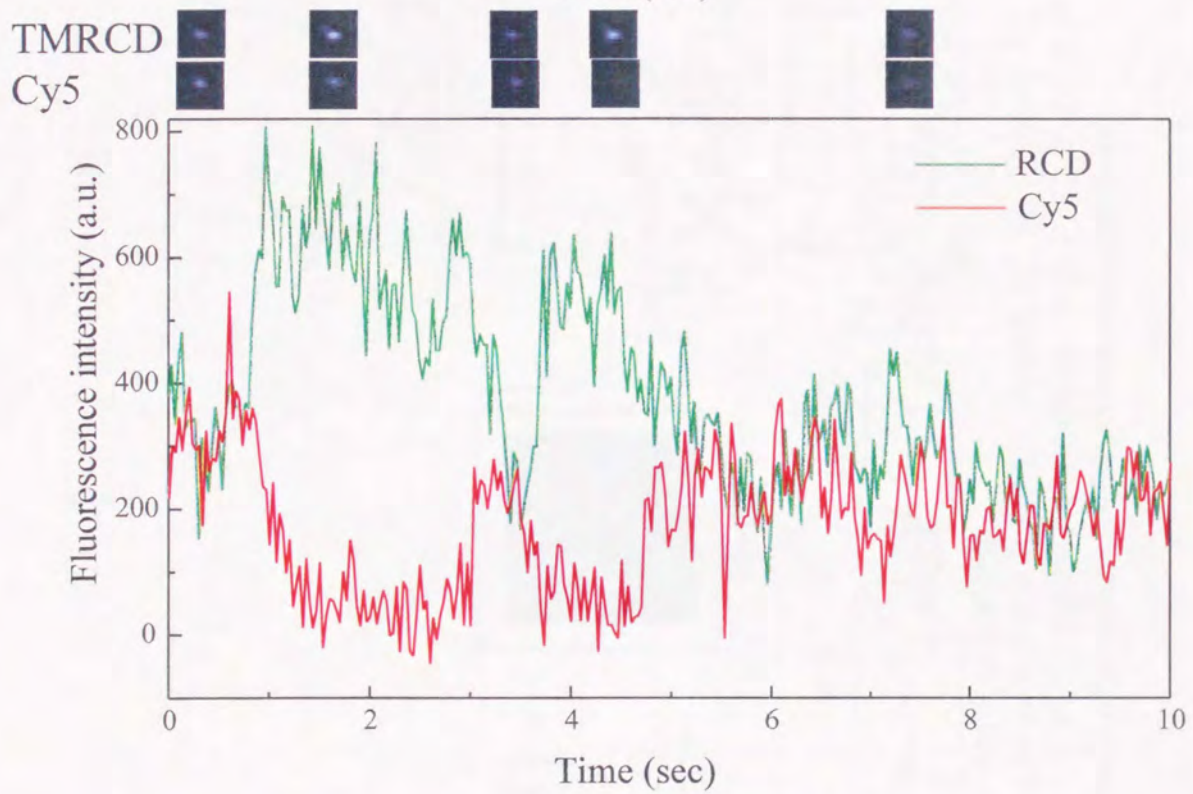
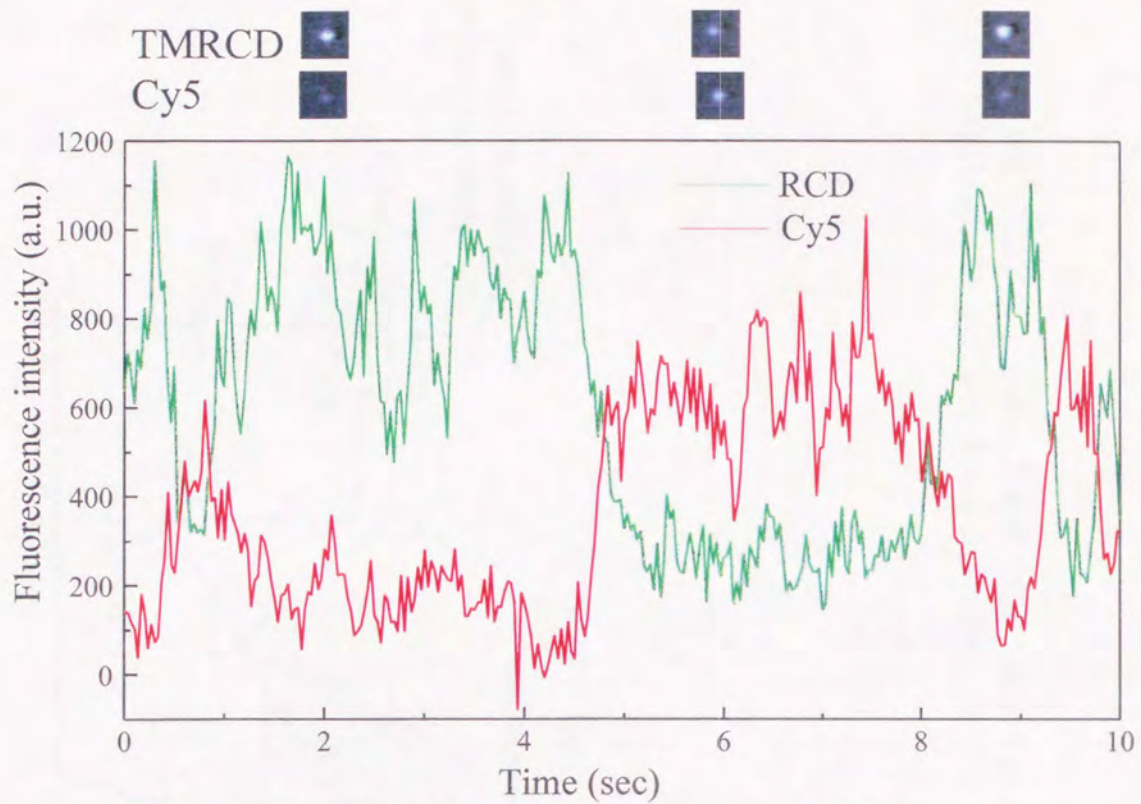


図30 アクチン1分子内の1分子蛍光エネルギー移動

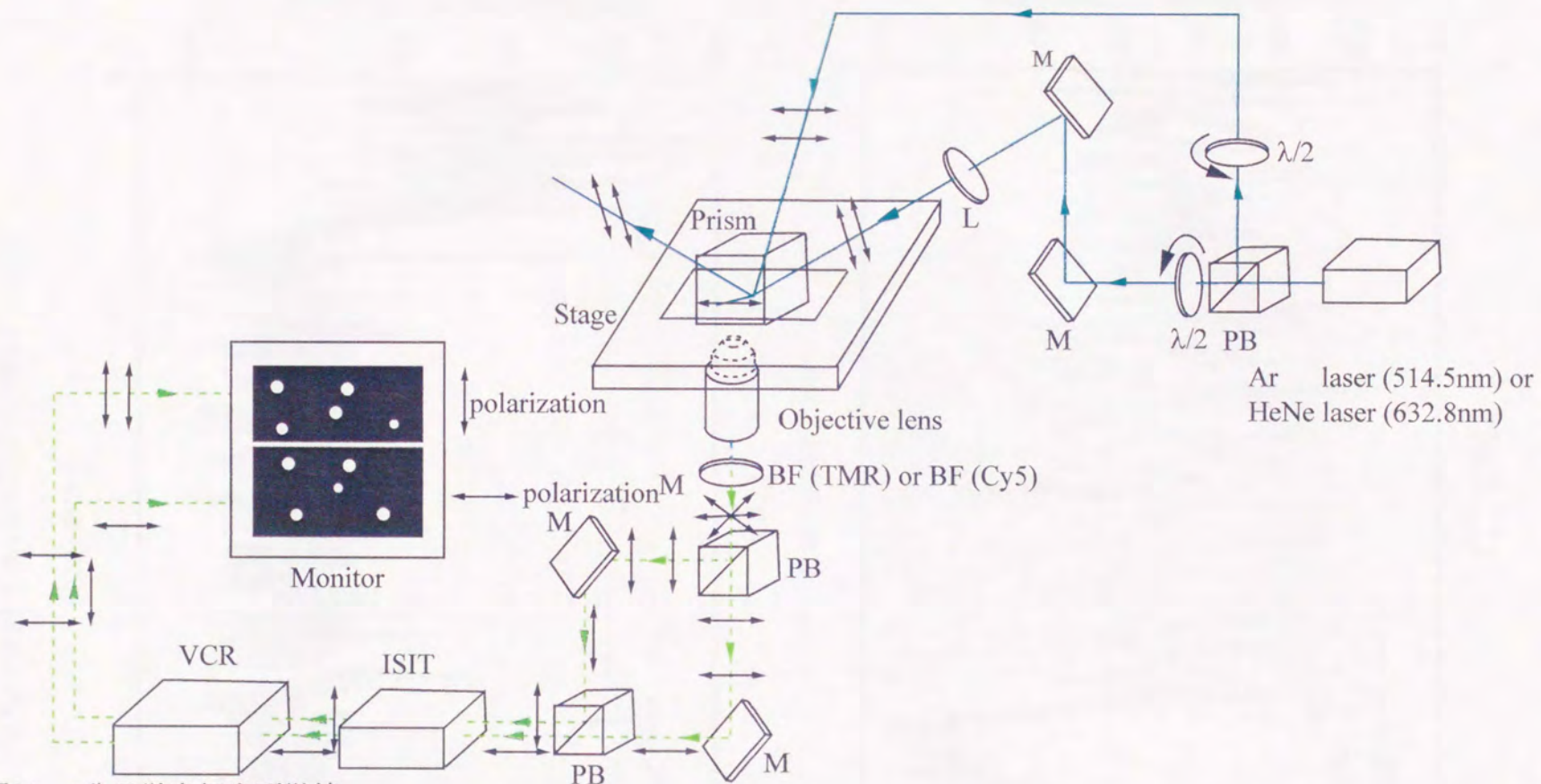
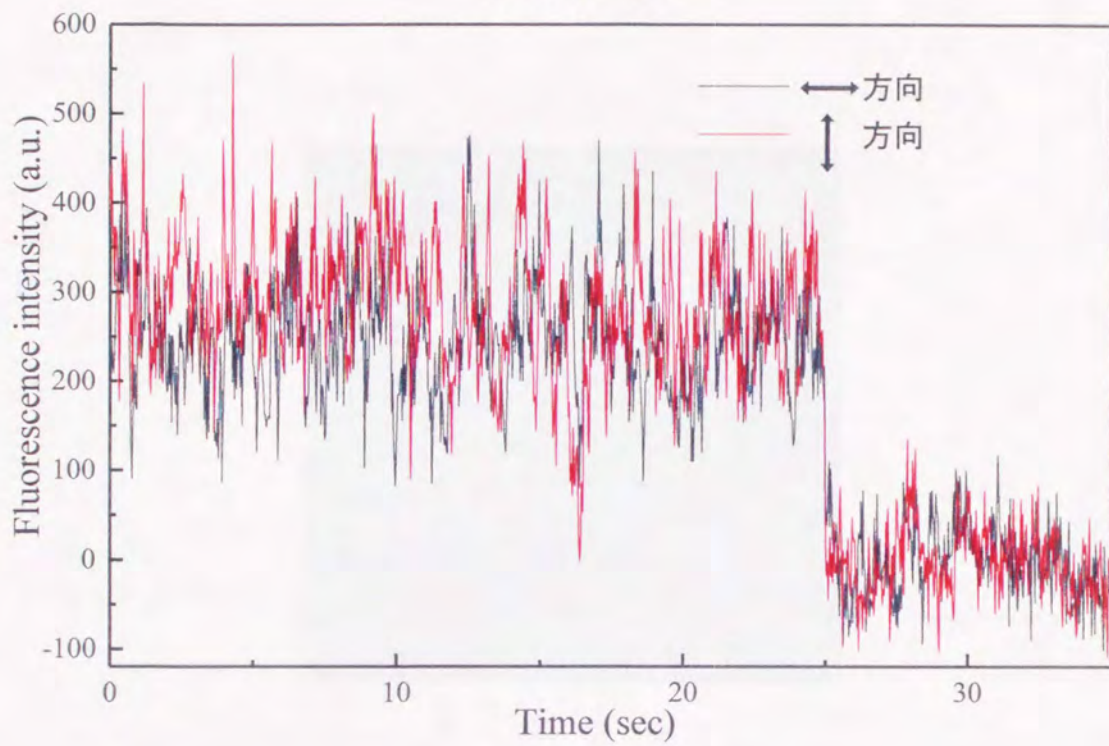


図31 1分子蛍光偏光顕微鏡

PB、偏光ビームスプリッター。 $\lambda/2$ 、半波長板。M、ミラー。L、レンズ。DM、ダイクロイックミラー。BF (TMR)、バンドパスフィルター (TMR用)。BF (Cy5)、バンドパスフィルター (Cy5用)。PB、偏光ビームスプリッター。ISIT、Image intensified SIT camera。VCR、Video cassette recorder。

TMRC



Cy5

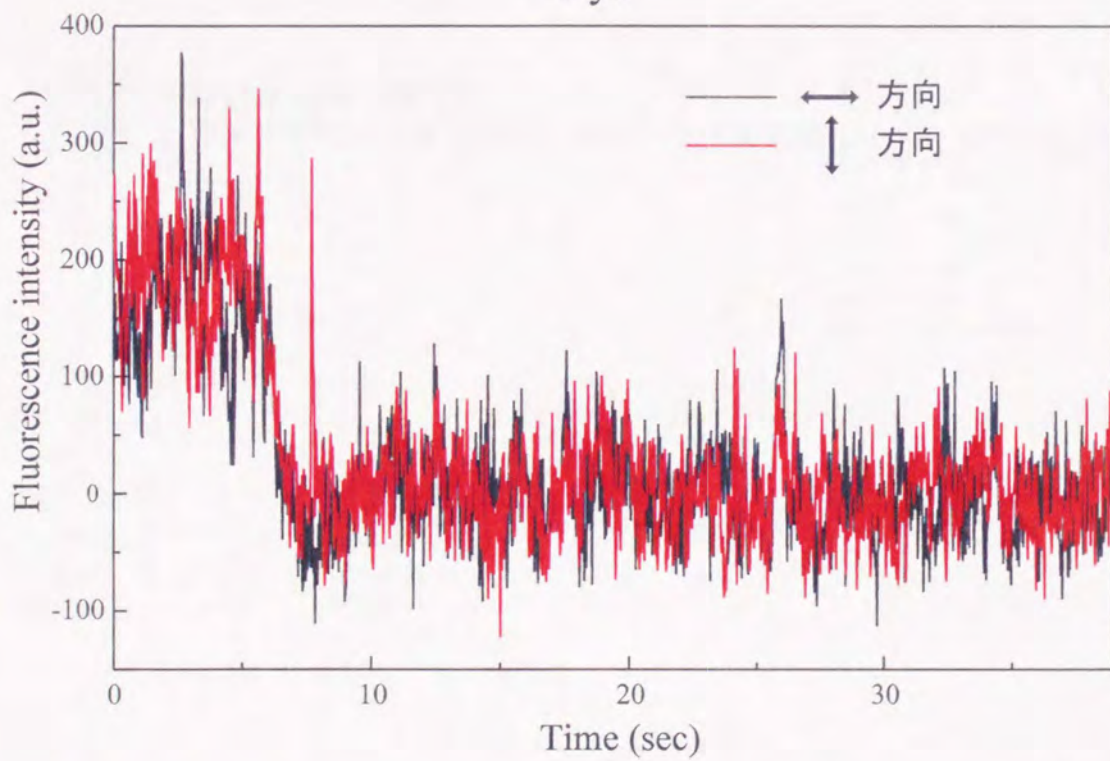


図32 TMRCとCy5の1分子偏光の時間変化

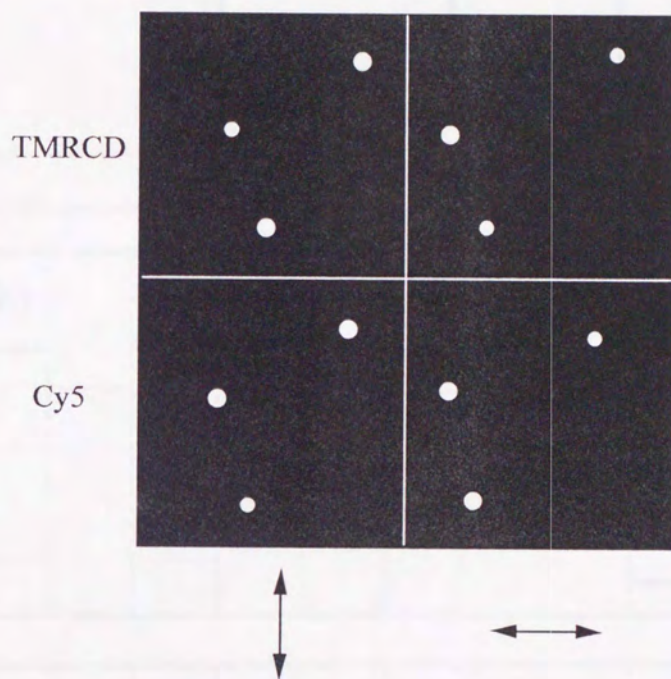


図33 Dual-dual viewの模式図
ドナーとアクセプターの蛍光強度と偏光の状態を同時にイメージングする。

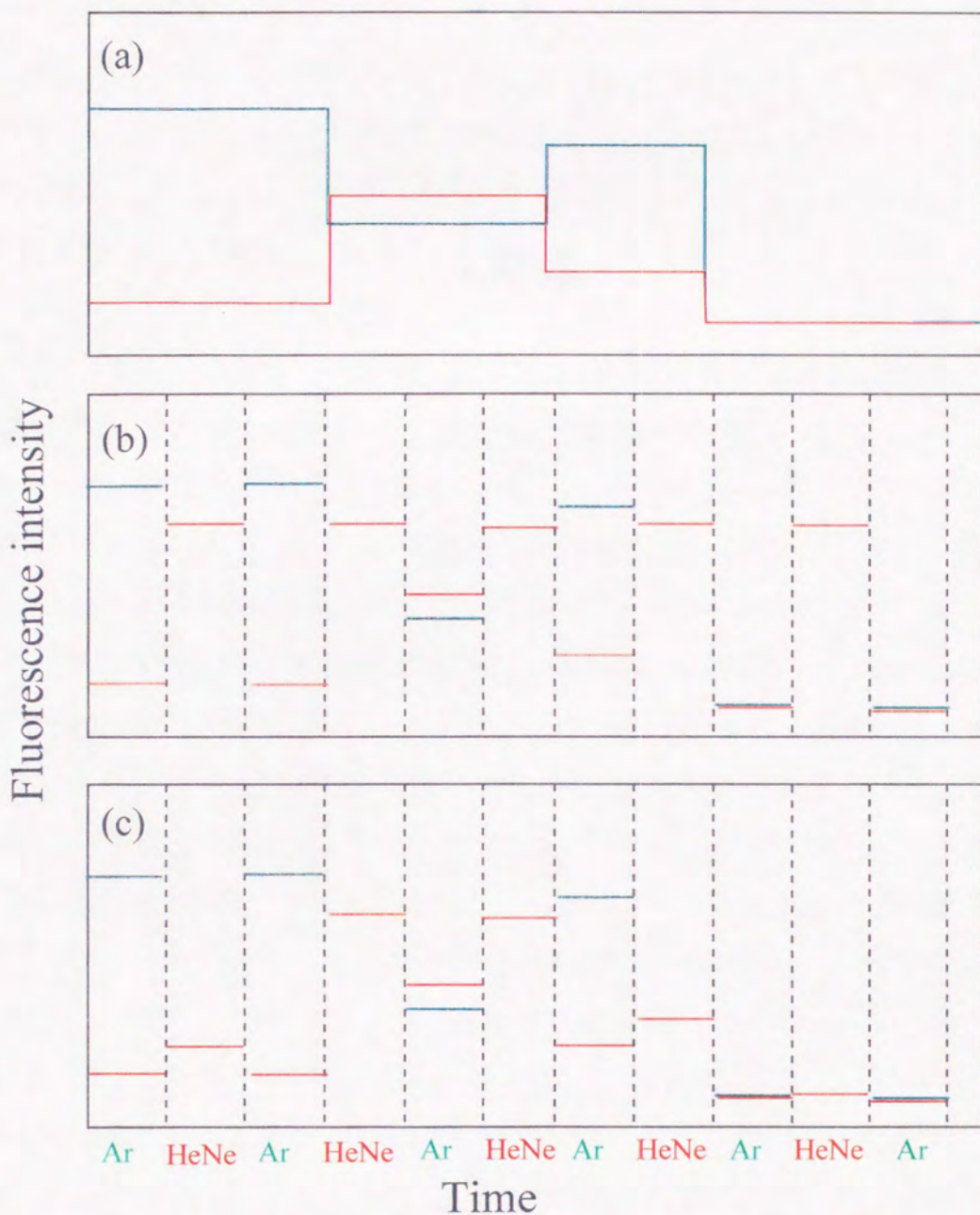


図34 ブリンキングの有無を調べる方法
 (a)1分子FRETの時間変化。(b)ブリンキングが存在しない場合に予想される時間変化。(c)ブリンキングが存在する場合に予想される時間変化。

4.総括

本研究では、数々のグループが達成した最先端分子イメージング技術を生かして、数種のアミノ酸タンパク質の構造（3D構造）の研究と、タンパク質1分子内での分子の構造を明らかにした。これによって、タンパク質構造の分子イメージングが実現した。

4.総括

本研究によって、最先端技術したタンパク質1分子を、世界で初めて白金原子層上で高解像度で観察する手法を開発した。この手法で、タンパク質の構造を明らかにした。これは、従来の手法よりも約10倍速くイメージングすることによって実現した。

また、分子構造エネルギー解析ソフトウェアによってタンパク質（アミノ酸）1分子内の構造が明らかになっているらしいデータが得られた。

これらの技術により、タンパク質が金属である利点を活かし、Self-Assembled Monolayer 技術などを用いてタンパク質や脂質分子を金属表面に選択的に配列させ、単一のタンパク質分子集合体を作り、その中のタンパク質1分子をイメージングし、タンパク質集合体中の1分子の構造を解析する装置が開発された。また、細胞内の情報伝達に重要な役割を担っているタンパク質、遺伝子の基本的メカニズム（DNA-RNAタンパク質合成）、細胞内での物質輸送、分子認識の機構の研究に1分子イメージング技術を用いれば、複雑系のなかの1分子の役割が明らかにできる可能性がある。さらに、タンパク質1分子のフォールディングの機構も明らかにすることができると思われる。

これらの研究が突破口となり、生物分野のみならず物理学、化学領域での科学全体にフィードバックをもたらすのではないかと考えられる。

4.総括

本研究では、我々のグループが開発した蛍光 1 分子イメージング技術を発展させ、表面プラズモン共鳴蛍光顕微鏡 (SPRFM) の開発と、タンパク質 1 分子内 FRET の測定に成功した。これによって、タンパク質動態の 1 分子イメージングに成功した。

SPRFM によって、蛍光標識したタンパク質 1 分子を、世界で初めて①金属表面上で、②低背景光で、③活性を保ったまま、④水溶液中で、⑤従来の全反射のしみだし光を用いた場合よりも明るく (数倍から 10 数倍)、イメージングすることに成功した。

また、1 分子蛍光エネルギー移動分光顕微鏡によってタンパク質 (アクチン) 1 分子内の構造が遅くゆらいでいるらしいデータが得られた。

これらの技術により、表面が金属である利点を生かし、Self-Assembled Monolayer 技術などを用いてタンパク質や脂質分子を金属表面上に規則的に配列させ、整列した生体分子集合体を作り、その中の生体分子 1 分子をイメージングし、生体分子集団中での 1 分子の挙動を探索する道筋が開けた。また、細胞内の情報伝達に重要なはたらきをしている G タンパク、遺伝の基本的メカニズム (DNA→RNA→タンパク質合成)、細胞内での物質輸送、分子認識の機構の研究に、1 分子イメージング技術を用いれば、複雑系のなかの 1 分子の役割も解明にも応用できる可能性がある。さらに、タンパク質 1 分子のフォールディングの過程も追うことができると思われる。

これらの研究が突破口となり、生物分野のみならず物理学、微小領域での科学全体にフィードバックをもたらすのではないかと考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導くださいました柳田敏雄教授に深く感謝いたします。

本学基礎工学部の佐藤俊輔教授、村上富士夫教授には、本論文の副査として論文を査読してくださいました。心よりお礼申し上げます。

未熟な私が研究をすすめる上で、日々、御指導、御助言をくださいました科学技術振興事業団柳田生体運動子プロジェクトの石井由晴博士、船津高志博士、原田慶恵博士、齋藤究博士、その他の方々全員に感謝します。

また、大阪大学基礎工学部生物工学科柳田研究室の皆様にも、長きにわたりお世話になったことを感謝の意を表します。

最後に、電磁場の強度の計算法を詳しく教えてくださった大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻の加野裕博士にもお礼申し上げます。

参考文献

Ambrose, W. P. and Moerner, W. E. (1991) Fluorescence spectroscopy and spectral diffusion of single impurity molecules in a crystal. *Nature (London)* **349**, 225-227.

Ambrose, W. P., Goodwin, P. M, Martin, J. C. and Keller, R. A. (1994) Alternations of single molecule fluorescence lifetimes in near-field optical microscopy. *Science* **265**, 364-367.

Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.

Axelrod, D. (1989) Total internal reflection fluorescence microscopy. *Method. Cell Biol.* **30**, 245-270.

Bain, C. D. and Whitesides, G. M. (1988) Molecular-level control over surface order in self-assembled monolayer films of thiols on gold. *Science* **240**, 62-63.

Betzig, E. and Chichester, R. J. (1993) Single Molecules Observed by Near-Field Scanning Optical Microscopy. *Science* **262**, 1422-1425.

Buckman, A. B. and Kuo, C. (1979) Coupled surface plasmons in structures with thin metallic layers. *J. Opt. Soc. Am* **69**, 343-347.

Chen, C. Y., Davoli, I., Ritchie, G. and Burstein, E. (1980) Giant Raman scattering and luminescence by molecules adsorbed on Ag and Au metal island films. *Surf. Sci.* **101**, 363-366.

Dale, R. E., Eisinger, J., Blumberg, W. E. (1979) The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys J.* **26** 161-193.

Dickson, R. M., Cubitt, A. B., Tsien, R. Y. and Moerner, W. E. (1997) On/off blinking and switching behavior of single molecules of green fluorescent protein. *Nature (London)* **388**, 355-358.

dos Remedios, C. G., Moens, P. D. (1995) Actin and the actomyosin interface: a review. *Biochim Biophys Acta* **1228**, 99-124.

dos Remedios, C. G. and Moens, P. D. (1995) Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes in proteins. Dispelling the problem of the unknown orientation factor. *J. Struct. Biol.* **115**, 175-185.

Duschl, C., Liley, M., Corradin, G. and Vogel, H. (1994) Biologically addressable monolayer structures formed by templates of sulfur-bearing molecules. *Biophys. J.* **67**, 1229-1237.

Egami, C., Takeda, K., Isai, M. and Ogita, M. (1996) Evanescent-wave spectroscopic fiber optic pH sensor. *Opt. Commun.* **122**, 122-126.

Förster, T. (1948) Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Physik (Leipzig)* **2**, 55-75.

Frauenfelder, H., Sligar, S. G. and Wolynes, P. G. (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science* **254**, 1598-1603.

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

Ha, T., Enderle, Th., Ogletree, D. F., Chemla, D. S., Selvin, P. R. and Weiss, S. (1996) Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy

transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6264-6268.

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

Harada, Y. (1997) *Abstracts for 2nd East Asian Symposium on Biophysics* 41.

Hartstein, A., Kirtley, J. R. and Tsang, J. C. (1980) Enhancement of the infrared absorption from molecular monolayers with thin metal overlayers. *Phys. Rev. Lett.* **45**, 201-203.

Hayashi, S., Yamada, T. and Kanamori, H. (1981) Light scattering study of surface plasmon resonances in very thin silver films. *Opt. Commun.* **36**, 195-199.

Hellen, E. H. and Axelrod, D. (1987) Fluorescence emission at dielectric and metal-film interfaces. *J. Opt. Soc. Am. B* **4**, 337-350.

Higuchi, H., Muto, E., Inoue, Y., and Yanagida, T. (1997) Kinetics of force generation by single kinesin molecules activated by laser photolysis of caged ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4395-4400.

Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., Kabsch, W. (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature (London)* **347**, 44-49.

Holmes, K. C., Tirion, M., Popp, D., Lorenz, M., Kabsch, W., Milligan, R. A. (1993) A comparison of the atomic model of F-actin with cryo-electron micrographs of actin and decorated actin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **332**, 15-22.

Ishii, Y., Funatsu, T., Wazawa, T., Yoshida, T. Watai, J. and Yanagida, T. (1997)

Communication between troponin-C and I revealed by single molecule fluorescence spectroscopy and FRET. *Biophys. J.* **72**, A283.

Ishijima, A., Kojima, H., Higuchi, H., Harada, Y., Funatsu, T. and Yanagida, T. (1996) Multiple- and single-molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle: Unitary steps and forces. *Biophys. J.* **70**, 383-400.

Ito, Y., Yamasaki, K., Iwahara, J., Terada, T., Kamiya, A., Shirouzu, M., Muto, Y., Kawai, G., Yokoyama, S., Laue, E. D., Walchli, M., Shibata, T., Nishimura, S., Miyazawa, T. (1997) Regional polyesterism in the GTP-bound form of the human c-Ha-Ras protein. *Biochemistry*, **36** 9109-9119.

Iwane, A. H., Kitamura, K., Tokunaga, M. and Yanagida, T. (1997) Myosin subfragment-1 is fully equipped with factors essential for motor function. *BBRC* **230**, 76-80.

Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. and Holmes, K. C. (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature (London)* **347**, 37-44.

Kano, H., and Kawata, S. (1995) Grating-coupled surface plasmon for measuring the refractive index of a liquid sample. *Jpn. J. Appl. Phys.* **34**, 331-335.

Kim, E., Motoki, M., Seguro, K., Muhlrad, A. and Reisler, E. (1995) Conformational changes in subdomain 2 of G-actin: fluorescence probing by dansyl ethylenediamine attached to Gln-41. *Biophys. J.* **69**, 2024-2032.

Kinoshita, K. Jr., Itoh, H., Ishiwata, S., Hirano, K., Nishizaka, T. and Hayakawa, T. (1991) Dual view microscopy with a single camera: Real-time imaging of molecular orientations and calcium. *J. Cell Biol.* **115**, 67-73.

Kneipp, K., Yang, Y., Kneipp, H., Perelman, L. T., Itzka, I., Dasari, R. R. and Feld, M. S. (1997) Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.* **78**, 1667-1669.

Kretschmann, E. (1971) The determination of the optical constants of metals by excitation of surface plasmons. *Z. Physik* **241**, 313-324.

Lang, H., Duschl, C. and Vogel, H. (1994) A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces. *Langmuir* **10**, 197-210.

Liedberg, B., Nylander, C. and Lundström, I. (1983) Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sens. Actuators* **4**, 299-304.

Löfås, S., and Johnson, B. (1990) A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *Chem. Commun.* **21**, 1526-1528.

Lu, H. P. and Xie, X. S. (1997) Single-molecule spectral fluctuations at room temperature. *Nature (London)* **385**, 143-146.

Macklin, J. J., Trautman, J. K., Harris, T. D., Brus, L. E. (1996) Imaging and Time-Resolved Spectroscopy of Single Molecules at an Interface. *Science* **272**, 255-258.

Margossian, S. S., Lowey, S. and Barshop, B. (1975) Effect of DTNB light chain on the interaction of vertebrate skeletal myosin with actin. *Nature (London)* **258**, 163-166.

Matsubara, K., Kawata, S. and Minami, S. (1988) Optical chemical sensor based on surface plasmon measurement. *Appl. Opt.* **27**, 1160-1163.

McMeekin, T. L., Groves, M. L. and Hipp, N. J. (1963) Refractive indices of amino acids, proteins, and related substances, *Advances in chemistry series* **44**, 54-66.

Miki, M., O'Donoghue, S. I., dos Remedios, C. G. (1992) Structure of actin observed by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* **13**, 132-145.

Moens, P. D., Yee, D. J. and dos Remedios, C. G. (1994) Determination of the radial coordinate of Cys-374 in F-actin using fluorescence resonance energy transfer spectroscopy: effect of phalloidin on polymer assembly. *Biochemistry* **33**, 13102-13108.

Moens, P. D., dos Remedios, C. G. (1997) A conformational change in F-actin when myosin binds: fluorescence resonance energy transfer detects an increase in the radial coordinate of Cys-374. *Biochemistry* **36**, 7353-7360.

Moraczewska, J., Strzelecka-Golaszewska, H., Moens, P. D., dos Remedios, C. G. (1996) Structural changes in subdomain 2 of G-actin observed by fluorescence spectroscopy. *Biochem. J.* **317**, 605-611.

Müller, W., Rump, E., Wildburg, G., Zhang, X., Angermaier, L., Knoll, W., Liley, M. and Spinke, J. (1993) Attempts to mimic docking Processes of the immune system: recognition-induced formation of protein multilayers. *Science* **262**, 1706-1708.

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

Nylander, C., Liedberg, B. and Lind, T. (1982/83) Gas detection by means of surface plasmon resonance. *Sens. Actuators* **3**, 79-88.

Palik, E. D. (1985) *Handbook of Optical Constants of Solids*, edited by (Academic Press, San Diego).

Pockrand, I., Brillante, A. and Möbius, D. (1980) Nonradiative decay of excited

molecules near a metal surface. *Chem. Phys. Lett.* **69**, 499-504.

Raether, H. (1988) *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings*, Springer Tracts in Modern Physics **111** (Springer, Berlin, Heidelberg, New York).

Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C., Milligan, R. A. (1993) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**, 58-65.

Reisler, E. (1982) Sulfhydryl modification and labeling of myosin. in *Methods in Enzymology*, edited by D. W. Frederiksen and L. W. Cunningham, (Academic Press, London) **85**, 84-93.

Salamon, Z., Wang, Y., Brown, M. F., Macleod, H. A. and Tollin, G. (1994) Conformational changes in rhodopsin probed by surface plasmon resonance spectroscopy. *Biochemistry* **33**, 13706-13711.

Sasaki, Y., Yasuda, K., Suzuki, Y., Ishibashi, T., Satoh, I., Fujiki, Y. and Ishiwata, S. (1997) Two-dimensional arrangement of a functional protein by cysteine-gold interaction: enzyme activity and characterization of a protein monolayer on a gold substrate. *Biophys. J.* **72**, 1842-1848.

Sase, I., Miyata, H., Ishiwata, S. and Kinoshita, K. Jr. (1997) Axial rotation of sliding actin filaments revealed by single-fluorophore imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5646-5650.

Schroder, R. R., Manstein, D. J., Jahn, W., Holden, H., Rayment, I., Holmes, K. C. and Spudich, J. A. (1993) Three-dimensional atomic model of F-actin decorated with Dictyostelium myosin S1. *Nature (London)* **64**, 171-174.

Simon, H. J., Mitchell, D. E. and Watson, J. G. (1974) Optical second-harmonic

generation with surface plasmons in silver films. *Phys. Rev. Lett.* **33**, 1531-1537.

Spudich, J. A. and 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. Mol. Biol.* **246**, 4866-4871.

Stenberg, E., Persson, B., Roos, H., and Urbaniczky, C. (1991) Quantitative determination of surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid Interface Sci.* **143**, 513-526.

Stewart, R. J., Thaler, J. P., and Goldstein, L. S. (1993) Direction of microtubule movement is an intrinsic property of the motor domains of kinesin heavy chain and *Drosophila* ncd protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 5209-5213.

Stipe, B. C., Rezaei, M. A., Gao, S., Persson, M., and Lundqvist, B. I. (1997) Single-molecule dissociation by tunneling electrons. *Phys. Rev. Lett.* **78**, 4410-4413.

Stryer, L., Haugland, R. P. (1967) Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 719-726.

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

Takashi, R. (1988) A novel actin label: A fluorescent probe at glutamine-41 and its consequences. *Biochemistry* **27**, 938-943.

Tokunaga, M., Kitamura, K., Hikikoshi-Iwane, A. and Yanagida, T. (1997) Single molecules imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 47-53.

Toyoshima, Y. Y., Toyoshima, C. and Spudich, J. A. (1989) Bidirectional movement of actin filaments along tracks of along myosin heads. *Nature (London)* **341**, 154-156.

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

Vale, R. D., Funatsu, T., Pierce, D. W., Romberg, L., Harada, Y., and Yanagida, T. (1996) Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature (London)* **380**, 451-453.

Xie, X. S. and Dunn, R. C. (1994) Probing single molecule dynamics. *Science* **265**, 361-364.

Xu, X. and Yeung, E. S. (1997) Direct measurement of single-molecule diffusion and photodecomposition in free solution. *Science* **275**, 1106-1109.

Weber, W. H. and McCarthy, S. L. (1975) Surface-plasmon resonance as a sensitive optical probe of metal-film properties. *Phys. Rev. B.* **12**, 5643-5650.

Weber, W. H. and Ford, G. W. (1981) Optical electric-field enhancement at a metal surface arising from surface-plasmon excitation. *Opt. Lett.* **6**, 122-124.

Weeds, A. G. and Pope, B. (1977) Studies on the chymotryptic digestion of myosin: effects of divalent cations on proteolytic susceptibility. *J. Mol. Biol.* **111**, 129-157.

Weitz, D. A., Garoff, S., Gersten, J. I. and Nitzan, A. (1983) The enhancement of Raman scattering, resonance Raman scattering, and fluorescence from molecules adsorbed on a rough silver surface. *J. Chem. Phys.* **78**, 5324-5338.

辻内順平 (1979) 光学概論 (朝倉書店)

加野 裕 (1994) 表面プラズモン共鳴を用いた高感度光センシングに関する研究、博士論文、大阪大学工学研究科

和沢鉄一 (1997) Single molecular imaging of dynamics for a calcium binding protein complex. 博士論文、大阪大学基礎工学研究科

