

LECTURES

生理学実験法講座「1分子生理学」 細胞内情報処理過程の1分子観察

大阪大学大学院・生命機能研究科・ナノ生体科学講座
科学技術振興事業団・若手個人研究
「タイムシグナルと制御」

佐甲 靖志

はじめに

蛍光顕微鏡を用いた細胞内1分子可視化の技法を紹介する。一般に細胞内の分子は反応ネットワークの一員として機能している。1分子計測はネットワーク中の各反応素過程の定量的な解析のための方法として有力である。

I. 細胞内1分子可視化計測の利点

1分子計測は多く分子を対象とする現在の生物学・医学においては究極の高感度検出法である。個々の分子の位置を数十ナノメートルの精度で求めることも出来る。(ガラス基盤上では1.5 nmが達成されている。)しかし、1分子計測の利点は単なる高感度・高精度にあるのではない。

反応の同期をとる必要がない。時間軸に沿ったデータを多分子計測で得るためには、多数分子の反応を同期させる仕掛けがいる。しかし、細胞内の複雑な分子ネットワークの中間段階で多分子を同期させることは難しい。1分子計測なら個々のイベントを独立に観測した後で、仮想的に反応開始点をそろえて統計解析を行えばよい。

反応パラメータの分布やゆらぎの情報を得ることが出来る。通常の計測では、反応パラメータの多数分子平均を得る。しかし、細胞内の微細構造や環境の多様性を考えると、多数分子の単純な平均値だけでは満足できない。また、細胞応答は場合によっては100分子程度の反応で起こり得るらしい。関与する分子数が少なくなるとゆらぎの影

響が無視できなくなってくる。

入出力の共役を1イベント毎にデジタル的に定量することができる。1分子計測では1回毎の分子反応の入力と出力を直接数えて比較することが出来る。生体分子の作動メカニズムを考える上で入出力応答の関係は必須の情報である。

II. 細胞内1分子可視化の装置

A. 全反射蛍光顕微鏡

本シリーズで既に登場した全反射蛍光顕微鏡(図1)は、細胞内1分子可視化にも用いることが出来る[1]。細胞の基底膜付近で全反射蛍光法を用いて1分子を観察することは比較的容易である。全反射蛍光顕微鏡は現在では市販されている。市販の装置でうまくいかないのは、ガラス基盤が汚くてゴミと1分子の見分けが付かないか、レーザーの出力が小さくて十分な蛍光発光が起こっていないことがほとんどである。

レーザー：細胞膜上にある蛍光色素をビデオレート(1秒間に30画像)程度で1分子観察するには、 $0.5 \sim 1 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ 位の励起光強度が欲しい。直径100 μm 位の視野を観察するとして試料面に5~10 mWの光が到達していなければならない。光学系の透過率を考えると最低20 mW、出来れば50 mW以上の出力を持つレーザーを用意する必要がある。市販の装置では光ファイバーでレーザー光を導き、かつ、視野が広いのもっと大きな出力を用意した方が安全である。

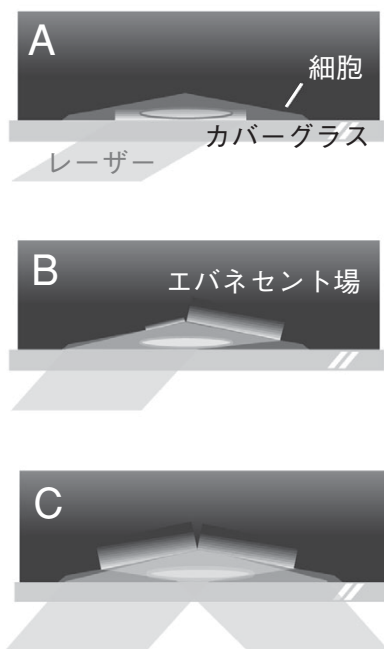


図1. 全反射蛍光顕微鏡による細胞観察. 入射角を変えることによって細胞の腹側 (A) または背側 (B) を観察することができるが, 細胞の形状が湾曲しているため背側では全面にわたる全反射観察は困難である. (C) 試料の両側から2本のレーザービームで照射することによって良好な画像を得ることができる.

対物レンズ：対物レンズを通してガラスと水の間の全反射を起こさせるには開口数 (NA) 1.33 以上が必要である. 多くの場合 NA1.4 や全反射用の NA1.45 の油浸対物レンズで十分に良好な画像が得られる. NA1.65 というレンズもあり, 広い範囲の入射角をとることができるが, 特殊なオイルやカバーガラスを必要とするので使い勝手はやや悪い. エバネセント場の厚みは波長, 入射角, 屈折率に依存する. 指数関数で減衰するが, 明るい試料では基盤からかなりの深さも見える. 減衰長の正確な計測は難しいが, 臨界角付近で細胞を見た場合には, $0.5 \mu\text{m}$ 程度の深さも見えていると思う. 本当に細胞表面近傍だけを見たいのなら, 入射角を大きくできるプリズム型を使う方がよいだろう. 電場の強度も入射角に依存して臨界角でもっとも強く (垂直入射の4倍程度), 角度をつ

けると減少する. 電場強度が上がれば光褪色もその分早くなる.

カメラ：ビデオレートの観察にはマイクロチャネルプレートを使ったイメージンテンシファイアと高感度 (正確には高増幅率) カメラを組み合わせる. イntenシファイアの増幅率は非常に高いので, カメラの増幅率はそれほど大きくなくても良い. サブ秒以上の長時間積算を行う場合には, 量子効率の高い背面照射型の冷却型 CCD カメラが良い. 最近開発された電子増倍型のカメラも利用できるだろう.

画像処理：細胞内で高い S/N の1分子画像を得るのは難しいので, ビデオレートのカメラでも画像処理装置で2—4 フレーム位のローリングアベレージ (リカーシブフィルター) を施すことが多い. 前の画像の履歴が残るので, 計測結果の解釈には注意を要する. 画像はデジタルビデオに記録している. ビデオレコーダのアナログ出力を画像入力ボード経由でパソコンに取り込むか, ムービー編集ソフトを使って DV 信号のままパソコンに取り込む. (冷却型 CCD カメラの場合は, 普通コンピュータに直接画像が取り込まれる.) 汎用の画像処理ソフトか自家製のソフトで, 基本的には点の明るさと位置 (動画なら運動) を計測することになる. 細胞内1分子画像の場合, バックグラウンドが空間・時間的に安定していないところで低 S/N の信号を扱うので, 万能の輝点抽出アルゴリズムはない. 今のところ, 最終的には目で見て確認している. これはかなり大変な作業である.

上皮など極性細胞では基底膜側とアピカル側とでは性質が大きく異なる. 細胞質と培養液の屈折率差を利用すればアピカル面を全反射法で観察することもできるが, 細胞の形状が屈曲しているため全面にわたる観察は困難である. ドーナツ型のビームで全方位から照明すれば良いのであるが, 実質的には試料の両側から2本のレーザービームで照射すればかなりの改善が見られる (図1C).

B. その他の細胞内1分子可視化法

ニポウディスクタイプの共焦点顕微鏡によるビデオレートでの1分子イメージングが行われている [2]. 分子濃度が高く全反射法では観察の難し

い場合に良いかもしれない。また、通常の落斜蛍光法でも特に背景光を減らすべく注意を払うことによって、一分子イメージングができる [3]。最近、低角の斜光照明が背景光を減らす方法として用いられている。固定した細胞標本ではプローブ走査型の近接場蛍光顕微鏡による1分子観察も行われている。分解能が高いので、分子が混み合った試料も扱うことができる [4]。

III. 標識、試料の調整法

A. 細胞内1分子可視化のプローブ

1分子可視化の蛍光プローブは、適度に大きい分子吸光係数を持ち、蛍光発光の量子効率が高く、光褪色しにくいことが求められる。細胞内では、励起光の細胞毒性が低く、自家蛍光にも邪魔されないなどの理由で、吸収、発光波長が長いものが好ましい。テトラメチルローダミン、Alexa488, Alexa594, Cy3, Cy5などは細胞内1分子観察に使用できる。

緑色蛍光蛋白質 (Green fluorescent proteins, GFPs) やその誘導体 YFP あるいは類似蛋白質のひとつ DsRed なども利用できる (DsRed は4量体である) が、立体障害、自発的多量体化、励起・検出波長の制約、普通は蛋白質末端しか標識できない、蛍光の点滅、比較的褪色しやすいなど不満もある。

GFP 間の解離定数は $110 \mu\text{M}$ であると報告されている。均一な溶液系でこの濃度に達することは普通考えられないし、そのような高濃度試料で1分子観察はそもそもできないが、標識相手の分子が会合体を作ったり、局所に濃縮されたりした場合には、問題が生じるかも知れない。206番目のアラニンのリジンに替えると解離定数は 74 mM に上昇する [5]。

B. 標識分子密度

1点から発した光は光学顕微鏡では数百ナノメートルにはけて見える。それ以上の密度で存在する輝点は重なり合って区別出来ない。細胞膜上では $1 \mu\text{m}^2$ あたり1輝点程度が区別できる上限である。

溶液系の分子濃度にも上限がある。溶液中の分

子運動は速いので、普通のカメラで輝点として捉えることは出来ないが、濃度に応じて背景光が上昇する。全反射蛍光顕微鏡では溶液中の濃度が 10 nM を越えると背景光が邪魔をして1分子観察が困難になる。

市販の GFP ベクターは非常に強力なプロモーターが付いており、しばしば発現量が多すぎることがある。プロモーター部位を適当に削りこんで行くことにより、発現量を減らすことが出来る [6]。

C. ガラス基盤での細胞培養

カバーガラス上のゴミは励起光を散乱し1分子観察を妨げる原因になる。また、きれいに洗浄したカバーガラス上でなければうまく細胞が接着しないことがある。我々は市販のカバーガラスを中性洗剤で洗浄し、さらに濃硫酸に一晩以上浸して表面のゴミを酸化して除いている。洗浄後のカバーガラスはエタノール中または滅菌して超純粋中に保存する。

この上に直接細胞を播き込むと接着しないことがあるので、ガラスを培地に浸して CO_2 インキュベータ中に数時間から一晩放置しておくとの良い。培地を新たなものに交換してから細胞を播く。

実験の1日前にフェノールレッドを含まない観察用の培地に交換する。これは必須ではないが多少バックグラウンド (フェノールレッドの蛍光) が減少する。

IV. 細胞内1分子観察の応用例

A. 細胞内分子動態を計測する。

細胞質に存在するリン酸化酵素 Raf1 は、細胞膜の裏側に存在する低分子量 GTPase Ras の GTP 結合型に結合し、細胞膜上で未知の反応経路によりリン酸化を受けて活性化される。N 末端に GFP を融合した Raf1 (GFP-Raf1) を発現する HeLa 細胞の Ras を活性化すると、GFP-Raf1 の膜結合は細胞膜全体で上昇するが、差し渡し数ミクロンのパッチ状に数カ所、特に GFP-Raf1 の集積が著しく起こる場所が現れることが観察された。この集積メカニズムを研究するために1分子計測を行った [7]。

図2A (左) は GFP-Raf1 を発現した細胞の Ras

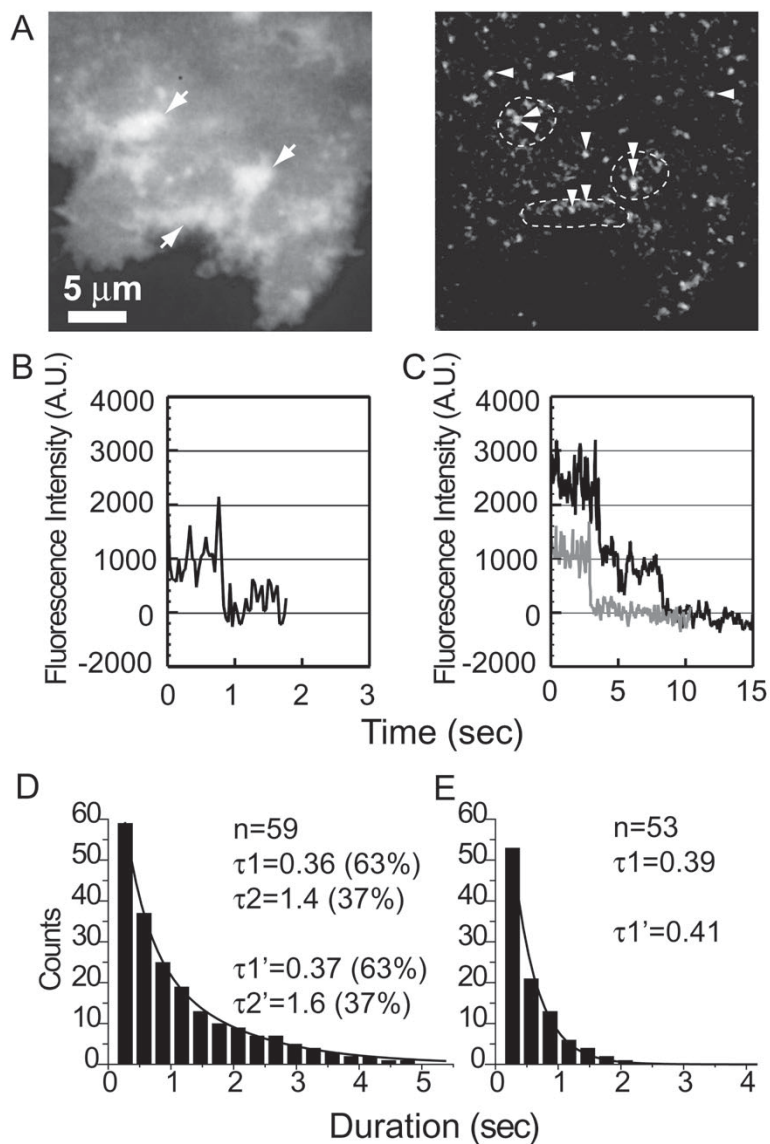


図2. 細胞膜上のGFP-Raf1の1分子観察。(A左)全反射蛍光顕微鏡による細胞膜に集積したGFP-Raf1の観察。矢印部分に特に強い集積が見られる。(A右)ほとんどの蛍光分子を褪色させると、GFP-Raf1の輝点が見えてくる(鉄)。(B、C)生細胞(B)、固定細胞(C)におけるGFP-Raf1輝点の蛍光強度変化。(D、E)GFP-Raf1の細胞膜からの解離曲線。集積部位(D)とそれ以外(E)に分けて、解離速度定数(τ_1 , τ_2)を求めた。

を上皮成長因子(EGF)で活性化してから35分後の状態である。この細胞にレーザー光を照射し続けるとGFPが褪色し、やがて残ったGFP-Raf1が輝点となって見えてくる(図2A右)。輝点は

細胞膜上を熱拡散運動している。輝点のひとつを追跡し、蛍光強度変化を見た(図2B)。輝点の明るさは約1秒間ほぼ一定で、突然消失する。1ないし数分子の会合体が粒子的に振る舞っているわ

けだが、輝点の消失が蛍光退色か細胞膜からの解離かは区別出来ない。細胞をメタノールで処理してGFP-Raf1を細胞膜に固定した。熱拡散運動は消失し、個々の輝点は1—2段の階段状に褪色する(図C)。階段の幅はほぼ一定しており、この幅が1分子の蛍光強度であると考えられる。生きている細胞で動き回っている輝点の蛍光強度もほぼ同様の値で、1分子のGFP-Raf1であることがわかる。多数分子について計測したGFP-Raf1の褪色の時定数は9.6秒であった。

GFP-Raf1が特に集積した所とそれ以外で、個々のGFP-Raf1の輝点が膜に現れてから消失するまでの時間と、拡散係数を計測した。輝点の消失はGFPの褪色に較べて遙かに速く、ほとんどは膜からの解離によるものと考えられる。輝点の細胞膜滞在時間の累積ヒストグラムを作製し、指数関数で近似した(図2D, E)。普通の細胞膜上では時定数0.39秒の1成分であったが、集積部においては、0.36秒(63%)と1.4秒(37%)の2成分が見られた。輝点の解離と褪色は独立であるとして、見かけの解離時間 τ と褪色時間9.6秒から真の解離時間を求めたものが図中の τ' である。

$$1/\tau = 1/\tau' + 1/9.6 \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

という関係がある。Raf1の集積部位には結合時間の長い特殊な結合部位が存在することがわかった。

輝点の拡散係数は集積部位とその他の膜上で、ともに平均 $0.04 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であった。(1粒子の運動から拡散係数を求める方法は文献8など)。Raf1の拡散運動は単純拡散と見分けが付かないものがほとんどであった。拡散係数と滞在時間の間に相関関係は見られなかった。

以上の結果から、Raf1は濃縮部位に特異的に現れる結合部位に約4倍長く滞在するが、集積部の密度は外部の5倍高いので、短い結合部位の密度も集積部で上昇していることがわかる。細胞膜全体にみられる約0.4秒の滞在時間の間にRaf1は $0.064 \mu\text{m}^2$ しか動き回ることが出来ないから、濃縮部位内外の側方拡散による分子交換はあまり起こっていない。滞在時間の長い結合部位が局在する機構はまだわからない。

B. 分子間相互作用を計測する。

細胞膜のEGF受容体にEGFが結合すると、受容体の細胞質部位にチロシンリン酸化がおこる。リン酸化チロシンを認識して受容体に結合するアダプター蛋白質Grb2と受容体の結合解離反応を細胞膜上で計測した。

A431細胞を高調液でしばらく処理した後、液を激しく吹き付けて基底膜を残して細胞をはぎ取る。こうしてガラス基盤上に残した細胞膜の受容体に蛍光色素Cy5でN末を標識したEGFを結合させる。この標識はEGFの生理活性には影響しない。過剰なCy5-EGFを洗い流した後に、ATP再生系を含む緩衝液中に試料を浸し、蛍光色素Cy3で標識したGrb2を加える(図3A)。Grb2はGST融合蛋白質として大腸菌に発現させ、アフィニティー精製した後にGSTを切断し、N末端をCy3で標識し、イオン交換カラムで1:1標識のものだけを精製した。Grb2はN端からSH3-SH2-SH3という構造を持っており、受容体を認識するのは中間のSH2ドメインである。

Cy5の蛍光でEGF—受容体複合体の位置を確認してから、顕微鏡のフィルターを切り替えてCy3の蛍光を1分子観察すると、受容体と同じ位置にCy3-Grb2が結合・解離する様子が観察できる(図3B, C)。結合から解離までの時間、解離から次の分子が結合するまでの時間、それぞれの累積ヒストグラムから解離速度定数、結合速度定数を求めることができる。結合速度定数を求めるには、溶液中のCy3-Grb2の濃度が既知でなければならない。図の実験では1 nMのCy3-Grb2を加えている。膜分画を使うのは、Cy3-Grb2の濃度を制御するためである。

結合反応、解離反応ともに1成分の指数関数には合わず、複数の分子認識の様式が存在することがわかった(図3D)。2成分の指数関数近似から、解離速度定数 5.2 s^{-1} (71%), 0.40 s^{-1} (29%) および結合速度定数 $0.53 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (59%), $0.073 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (41%) が得られた。これらの値から結合定数を計算すると、多数成分については9.8 nM, 少数成分は5.5 nMとなる。両成分は結合(平衡)定数で比較すると2倍の違いしかない

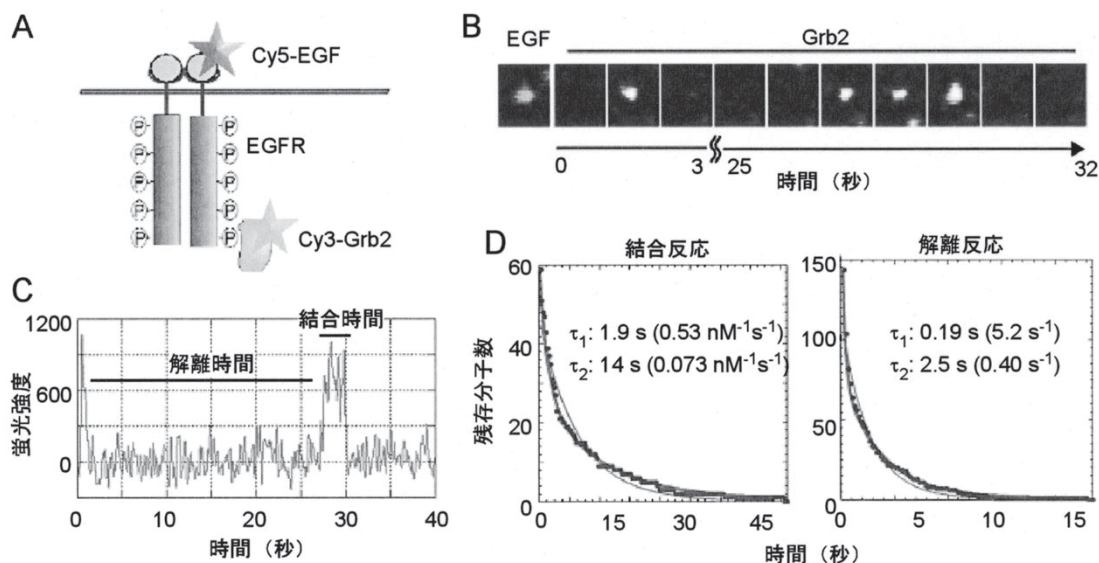


図3. 活性化型 EGF 受容体と Grb2 の結合・解離反応。(A) 細胞膜分画上で Cy5-EGF/EGF 受容体複合体と Cy3-Grb2 の結合解離を 1 分子計測する。(B, C) 受容体と Grb2 の結合・解離の時間経過。C は B の位置での蛍光強度の時間変化。(D) 1 分子計測から得られた解離時間, 結合時間から再構成した結合反応, 解離反応曲線。どちらも複数の成分を含んでいる。2 成分で近似した結果を図中に示す。

が, 結合・解離の速さは 10 倍異なっている。この反応速度の違いが何によって決まっているのか, 機能の違いに関係しているのか, ひとつの受容体分子の反応速度が変化するかなど興味は尽きないが, いずれも今後の課題である。

参考文献

1. Sako Y, Minoguchi S & Yanagida T : Single molecule imaging of EGFR signal transduction on the living cell surface. *Nature Cell Biol* 2 : 168–172, 2000
2. Tadakuma H, Yamaguchi J, Ishihama Y & Funatsu T : Imaging of single fluorescent molecules using video-rate confocal microscopy. *Biochem Biophys Res Comm* 287 : 323–327, 2001
3. Schütz G-J, Gerald K, Pastuchenko V-Ph & Schindler H : Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J* 19 : 892–901, 2000
4. de Lange F, Cmabi A, Huijbens R, de Bakker B, Rensen W, Garcia-Parajo M, van Hulst N & Figdor C-G : Cell biology beyond the diffraction limit : near-field scanning optical microscopy. *J Cell Sci* 114 : 4153–4160, 2001
5. Zacharias D-A, Violin J-D, Newton A-C & Tsien R-Y : Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296 : 913–916, 2002
6. Watanabe N & Mitchison T-J : Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* 295 : 1083–1086, 2002
7. Hibino K, Watanabe T-M, Kozuka J, Iwane A-H, Okada T, Kataoka T, Yanagida T & Sako Y : Single- and multiple-molecule dynamics of the signaling form H-Ras to cRaf-1 visualized on the plasma membrane of living cells. *Chem Phys* 4 : 748–753, 2003
8. Kusumi A, Sako Y & Yamamoto M : Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J* 65 : 2021–2040, 1993