

蛍光 1 分子イメージング顕微鏡の開発開始から 25 年

大阪大学 蛋白質研究所 教授 原田 慶恵

【私の研究】

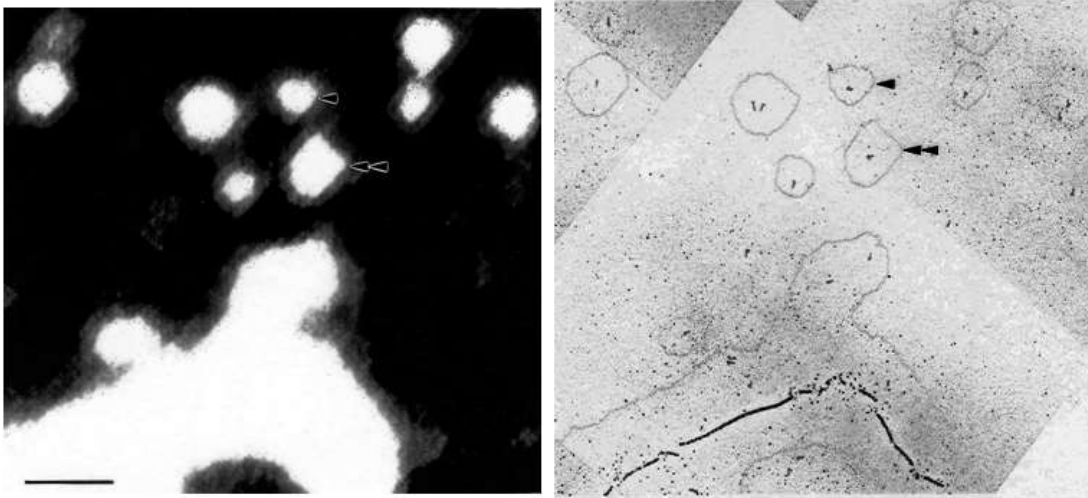
「1 分子生物学」と呼ばれる学問分野が確立されています。この分野を支えている技術に、1 つの分子だけを直視できる「1 分子イメージング」があります。

1992 年に新技術事業団（現在の科学技術振興機構）柳田運動子プロジェクトがスタートし、私は研究員の一人として参加しました。プロジェクトは 3 つのグループからなり、私は船津高志（現東京大学大学院薬学系研究科教授）さんをリーダーとする第一グループに所属することになりました。まず、船津さんと研究テーマについて考えました。もともと私も船津さんも、筋肉がどのような分子メカニズムで収縮するのかという課題について研究してきました。そこで筋収縮の分子メカニズムを知るために、何とかして個々の分子が機能している様子を直接観察したいという思いから、我々のグループの研究テーマを「一分子直視」としました。

水溶液中で機能する生体分子 1 個を光学顕微鏡で観察するには、何か目印を付ける必要があります。我々は、最も汎用性のある蛍光色素分子を目印とすることにしました。それからは、ひたすら蛍光色素 1 分子を観察することができる蛍光顕微鏡の開発に邁進しました。じゃまな背景光をできるだけ減らすよう改良した顕微鏡を使うことで、蛍光色素 1 分子が見えているかもしれないという手応えが得られ始めました。しかし、本当に見えているという確信が得られず、プロジェクトリーダーの柳田敏雄先生（現大阪大学大学院生命機能研究科特任教授）から「本当に 1 分子見えているの？」と問われ、「おそらく見えていると思うのですが・・・」という返事しかできず困っていました。そのとき、第三グループのリーダーの樋口秀男（現東京大学大学院理学系研究科教授）さんが「蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像を直接比較して 1 分子が見えていることを証明すれば」とアドバイスをくれました。直後は、「そんな実験難しすぎてできっこないよ」と思いましたが、船津さんと、「こうなったらやるしかない」と実験に取りかかりました。

我々がなじみのある筋肉タンパク質で特徴的なかたちのミオシン分子を Cy3 という蛍光色素で標識し、我々が改良した蛍光顕微鏡で試料の端から端まで観察し、蛍光像をビデオに

記録しました。このとき試料には、後で電子顕微鏡像と比較するための目印となる蛍光標識アクチンフィラメントを少量加えておきました。蛍光観察後の試料を真空中で乾燥させ、低角度回転蒸着法で影を付け、電子顕微鏡で観察し、くまなく写真撮影し現像しました。机に電子顕微鏡写真を並べ、蛍光のイメージと比較し、同じ場所を探した。なかなか見つからず来る日も来る日も実験を続けました。あるとき、裏返しにすればアクチンフィラメントの蛍光像と電子顕微鏡像の形状が合いそうなことに気づきました。見ていると、それは確信に変わりました。この時の感動は今も忘れられません。実は顕微鏡観察、試料作製、写真撮影、焼き付けなどの工程でおこる”ネガ”と”ポジ”の数え方を1回まちがえており、蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像が鏡像になってしまっていたのでした。蛍光像のスポットの位置と電子顕微鏡像のミオシン分子の位置はぴたりと一致していました（下図）。これで我々が蛍光色素1分子を観察できていることが証明されました。



蛍光色素 Cy3 で標識したミオシン分子とファロイジンローダミンで標識したアクチンフィラメントを雲母の薄いフィルム上に播き、1分子イメージ用に改良した蛍光顕微鏡で観察した像（左）。同じ視野を低角度回転蒸着法で影を付け観察した電子顕微鏡像（右）。下部にあるところどころ切れた黒い線状のものはアクチンフィラメントです。試料のミオシン分子はおよそ半分が1分子の Cy3 で、1/4 が2分子の Cy3 で標識されています。残りの約 1/4 は未標識です。蛍光スポットの明るさから判断して、矢頭1個は1分子の Cy3 で2個の矢頭は2分子の Cy3 で標識されたミオシン分子を示していると思われます。スケールバーは $1 \mu\text{m}$ 。

その後、全反射照明という、背景光を劇的に減少させる照明法を蛍光顕微鏡に組み込むことによって、1分子の蛍光色素を長時間安定に観察することができるようになりました。またこの4半世紀の間に、よりノイズの少ない高感度カメラの開発、光源に用いるレーザー、光学系に用いるミラーやフィルターの性能の向上など、1分子イメージングに重要なさまざまな技術が飛躍的に改良されています。現在では、対物レンズ型全反射照明を組み込んだ蛍光顕微鏡システムが大手顕微鏡メーカーから市販され、だれでも1分子イメージングの実験ができるようになってきました。2014年にノーベル化学賞を受賞した超解像顕微鏡も蛍光1分子イメージング技術が使われています。

我々はその後、蛍光1分子イメージング顕微鏡を使って、筋肉タンパク質だけでなく、生体内で物質輸送を担っている様々なモータータンパク質、RNAポリメラーゼやDNA修復に関与するタンパク質など遺伝子発現や維持、制御に関係するタンパク質の研究を行ってきました。蛍光1分子イメージングだけではなく、様々な1分子観察法や個々の分子を操作する技術の開発は、現在も世界中で進められています。1個の細胞内のすべての分子をイメージしようということも近い将来の研究目標として設定されるようになりました。今後1分子観察によってタンパク質分子の巧妙な機能のしくみや、細胞内での生体分子の挙動が明らかになっていくことが期待されます。

参考図書

「1分子生物学」原田慶恵・石渡信一編 化学同人 2014年10月10日発行