

# 時間分解顕微蛍光法

東大・教養・基礎科学科第一 楠見明弘

## 1. 序論

光学顕微鏡のルネッサンスという言葉を最近しばしば耳にする。特に、蛍光顕微鏡の生物物理学や細胞生物学への応用の広がりには、近年めざましいものがある。その理由は、複雑な細胞中において特定の分子だけを可視化し、その細胞内分布を観察するための技法が発達したことにある。しかし、一旦、光学顕微鏡レベルでの分布が見え始めるとますます詳しいことが知りたくなる。例えば図1を御覧下さい。これはマウス皮膚培養株細胞(ケラチノサイト)の蛍光顕微鏡像であるが、細胞間の接着構造体であるデスモソームの細胞質側にある膜裏打ちタンパク質のデスモブラキンに対する抗体を用いて染色したものである。隣接する細胞同士が強く接着しており、おもに細胞間の接着部位にデスモブラキンが集合していることがわかる。しかし、実際、分子レベルで見ればデスモブラキンは会合しているのだろうか? また、デスモブラキンはデスモソームの膜タンパク質と結合しているのだろうか? デスモブラキンは分子運動ができないほどがっちりとしてデスモソーム中で固定されているのだろうか? もしそうならば、デスモソーム形成のどの段階あたりで

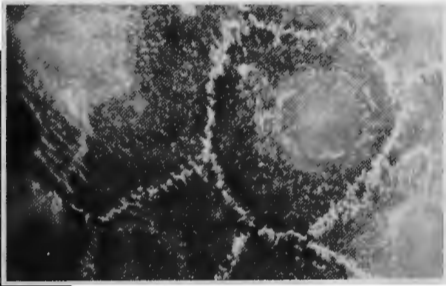


図1. マウス皮膚培養株細胞 (Pap.Fp7) の蛍光顕微鏡像。カルシウムスイッチ後6時間経過した細胞を、細胞間の接着構造体であるデスモソームの細胞質側にある膜裏打ちタンパク質のデスモブラキンI/IIに対する抗体を用いて染色したものである。隣接する細胞同士が強く接着しており、おもに細胞間の接着部位にデスモブラキンが集合していることがわかる。

## Time-resolved microfluorimetry

Akihiro KUSUMI

Department of Pure and Applied Sciences, College of Arts and Sciences, The University of Tokyo.

運動が停止させられるのだろうか? 蛍光顕微鏡をのぞいているとこのような疑問が次々と湧いてくる。もし、光学顕微鏡下で、生きている細胞の形態学的観察を行いつつ、分子の振舞いまで見ることができれば、これらの疑問に随分と答えることができるに違いない、などと夢想してしまう。本小文の主題の時間分解顕微蛍光法は、この夢を少しでも現実のものにしたいと思ったことから考え付いたものである。

もちろん、光学顕微鏡では分子レベルの分解能は得られようがない。そこで、蛍光分光法を利用することが考えられる。溶液中での分光法は既にかなり発達しており、分子構造や分子集合体の挙動を研究するために広く用いられている。従って、蛍光顕微鏡下で分光学的手法を用いることができれば、顕微鏡視野に見える構造の分子レベルでの情報が得られそうである。即ち、顕微鏡下で観測したい構造体を見いだしたら、その部分のみにスポット光を照射して、そのスポットからの蛍光をピンホールを用いて選択的に測光すればよい。

我々が特に知りたかったのは、分子間の距離、分子の運動状態の変化であった。これらを目安にして、分子の会合・集合を観測することができるからである。蛍光色素の分子間距離は共鳴エネルギー移動を測定することにより、また、運動状態は偏光解消法を用いて回転拡散を測定することによって調べることができる。

これらの測定において、最大の情報を得るためには、時間分解法を用いて蛍光減衰曲線を測定するのが最善である。また、蛍光顕微鏡下で生きている細胞という複雑な試料設定のもとで測定を行うためには、時間分解法を用いて励起状態の寿命を測定の方が蛍光スペクトルを測定するよりも正確である。蛍光スペクトルの測定は光路長や散乱の影響を受けやすく、対照試料との比較も簡単ではない。これに対し、蛍光寿命は、その絶対値を求めることができ、しかも、多成分の分子が存在する時にも、多成分の減衰曲線から各成分の寿命を得ることが可能である。以下においては、主に、蛍光顕微鏡下で共鳴エネルギー移動を時間分解法によって観測し(エネルギー移動が起こると寿命が短くなる)、分子の会合・集合を検出する方法について述べる。

## 2. 時間分解顕微蛍光光度計の構成

時間分解顕微蛍光光度計の概念図を図2に示す。光源はパルスレーザーで、波長は365nm、パルス幅は15ピコ秒、出力は数十ピコジュール/パルスである。このパルス光を蛍光顕微鏡の励起光軸上に導き、集光レ

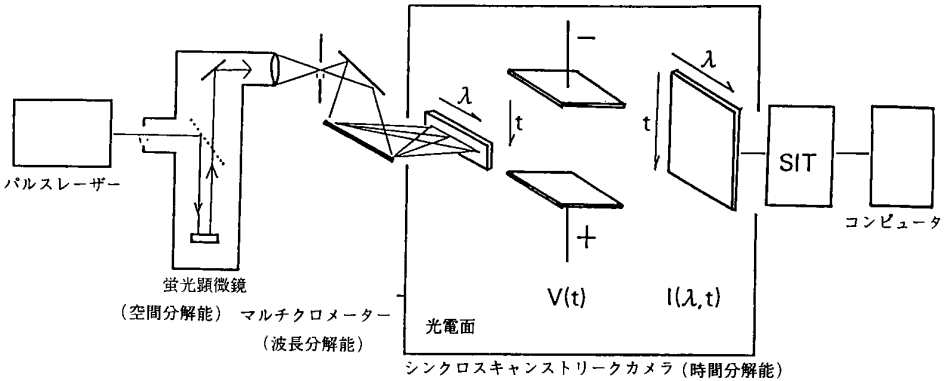


図2. 時間分解蛍光顕微鏡の概念図。時間分解能はパルスレーザーとストリークカメラによって、空間分解能は蛍光顕微鏡によって、波長分解能はマルチクロメータ(またはバンドパスフィルタ)によって与えられる。

レンズ・ピンホール・対物レンズを用いて試料の光軸上に集光する。測定したい部位を顕微鏡のステージを動かすことによって集光されたスポットにもってくる。スポットの直径は通常0.8-6 μm程度である。信号強度が十分に強ければ、0.2 μm程度にすることも可能である。試料からの蛍光は対物レンズによって集光された後、フィルターと像面におかれた直径可変のピンホールを通過し(共焦点測定)、最後に、時間分解・光検出・積算を行うストリークカメラに導かれる。

ところで、時間分解顕微蛍光測光の最大の問題点は、蛍光減衰曲線の信号/雑音比(S/N比)が非常に悪いところにある。数 μm<sup>2</sup>のスポットからの蛍光を100ピコ秒位の時間分解能で検出しようということなので、これは当然であろう。S/N比の改善のためには積算をすればよいのだが、生きている細胞が相手であるから何時間もかけて積算するわけにはいかない(市販のナノ秒蛍光減衰測定装置では、キューベット中の測定でも数十分を要する)。数十秒程度で一回の測定を終了し、刻々と変化する細胞の動態をほぼリアルタイムで次々と測定することが望ましいからである。そのためには、できるだけ速く積算を行う必要がある。そこで、大抵の蛍光分子の励起状態の寿命は10ナノ秒以下であり、200ナノ秒も待てば蛍光信号は減衰してしまうことを利用して、250ナノ秒毎に次の励起パルスを与えて減衰曲線を測定し積算することにした。この方法を用いれば、1秒間に400万回、50秒で2億回の積算が可能である(S/N比にして14,000倍の改善)。

図3に示した蛍光減衰曲線は、ヒト赤血球膜中に存在してガス交換に重要な役割を果たしているアニオン

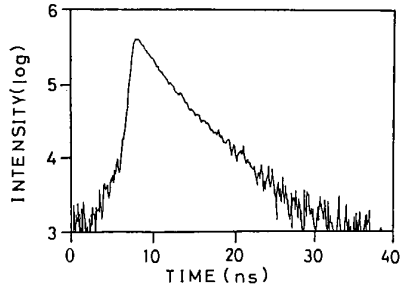


図3. ヒト赤血球膜のバンド3に対して特異的に結合されたフルオレセイン(色素:バンド3=1:1)の蛍光減衰曲線。油浸100倍の対物レンズを用いて、単一ゴースト膜上の直径2.5 μmのスポットにおいて、50秒間の積算を行ったもの。2 × 10<sup>5</sup>個の蛍光ラベルについて2億回積算すると、100以上のS/N比が得られることを示している。

チャンネル蛋白質のバンド3の1個のリジン基を特異的に5-(4,6-dichlorotriazin-2-yl)aminofluoresceinを用いてラベルした試料を測定したものである。油浸100×対物レンズを用いて、単一ゴースト膜上の直径2.5 μmのスポットに於て50秒間の積算を行ったもので、減衰曲線は1.66ナノ秒と4.42ナノ秒の時定数を持つ2つの指数関数の和で表されることがわかった。ゴースト膜中には1.2 × 10<sup>6</sup>コピーのバンド3が存在するので、2 × 10<sup>5</sup>個のバンド3分子に結合した色素からこの程度のS/N比が得られたことになる。

3. 時間分解顕微蛍光法の応用例: デスモソームの膜裏打ちタンパク質(デスモブラキンI/II)とアクチンとの結合

デスモソームは、隣接する上皮性細胞間に形成され、細胞間の強い接着に関与する細胞小器官である。完成

されたデスモソームには、中間径フィラメントのケラチンが結合していることが知られていたが、我々は、アクチン線維がデスモソームの形成と分解に必要であることを見いだした。また、デスモソームの形成時と分解時にはデスモブラキンをアクチン線維上に配列するように見えること、サイトカラシンDで細胞を処理するとアクチンの凝集体が観察されるが、同じ部分にデスモブラキンを凝集することを見いだした。このことから考えられるもっとも簡単な仮説はアクチンとデスモブラキンを直接的に結合しているということである。この仮説を検証するために、時間分解顕微蛍光法を用い、蛍光ラベルされたデスモブラキンを非蛍光性色素分子でラベルされたアクチンへの蛍光共鳴エネルギー移動 (RET) を観測した。

まず、サイトカラシンDで前処理したマウス皮膚培養細胞 Pap.Fp7 を、fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) ラベルの抗デスモブラキンを IgG 抗体と reactive red 8 (RR8) ラベルの抗アクチン IgG 抗体を用いることによって二重染色した (図4)。次に、サイトカラシンDによって誘起されたデスモブラキ凝集部位上の直径  $3.2\mu\text{m}$  のスポットからの、FITC-IgG-デスモブラキンの蛍光を時間分解法で測定し、蛍光減衰が RR8-抗アクチン抗体の有無によって変化するかどうか、即ち、デスモブラキとアクチンが  $50\text{\AA}$  程度の近い距離にあるかどうかを検討した。図5に示したように RR8 の存在下では FITC の蛍光減衰は速くなっている。IgG 抗体の結合の様式と IgG 分子の大きさによる不確実性はあるにしても、このデータは、デスモブラキとアクチンの間の距離が  $50\text{\AA}$  程度にまで接近していることを示している。この結果は、デスモブラキとア



図4. サイトカラシンDで前処理した後、FITC-抗デスモブラキ IgG 抗体を用いて染色されたマウス皮膚細胞 (ケラチノサイト)。デスモブラキンの凝集体が数ヶ所にみられ、抗アクチン抗体を用いて二重染色を行うと、同じ場所にアクチンが凝集しているように見える。

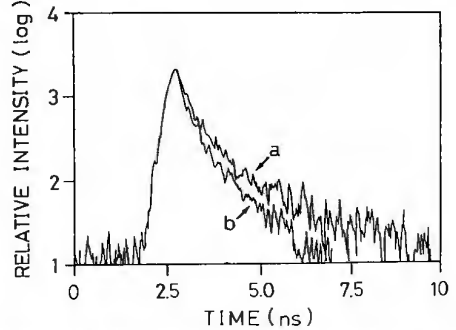


図5. 図4の試料を用いて、FITCの蛍光減衰曲線を、デスモブラキンの凝集部位上の直径  $3.2\mu\text{m}$  のスポットに於て測定したもの。RR8ラベルの抗アクチン抗体が存在しないとき(a)よりも存在するとき(b)の方がRETのために蛍光減衰が速くなっている。なお、ラベルしない抗アクチン抗体、または、デスモブラキにもアクチンにも結合しないIgGにRR8ラベルしたものを加えても、FITCの減衰曲線は(a)と同じであった。

クチンの結合を強く示唆するものである。

今後は、試料上の各点での蛍光寿命を測定し、蛍光寿命に基づくコントラストによって、新しい顕微鏡像を得ることを、行いたいと考えている。

#### 4. 謝辞

時間分解顕微蛍光法の開発は、京都大学の西俊一教授、浜松ホトニクスの早川毅氏、ウィスコンシン医科大学のJames S. Hyde教授の御支援の賜である。装置の製作に当たっては、京都大学の村田昌之、佐甲靖志、吉沢明康、及び、浜松ホトニクスの小石結、辻明彦の各氏のお世話になった。応用については、京都大学の阿久津哲雄、佐甲靖志、村田昌之の各氏に負うところが大きい。これらの方々に厚くお礼を申し上げたい。この研究にあたっては、文部省科学技術研究費60880029および米国 NIH グラント RR01755, GM35947の補助を受けた。

#### 文 献

- 1) A. Kusumi, A. Tsuji, M. Murata, Y. Sako, A. C. Yoshizawa, S. Ohnishi (1988) *Time-resolved laser spectroscopy in biochemistry* J. R. Lakowicz Ed. Proc. SPIE, 909, 350-351.
- 2) 楠見明弘 細胞工学 (1989年6月号予定).
- 3) 楠見明弘 実験医学 (1989年7月号予定).
- 4) 楠見ら 第26回日本生物物理学会年会予稿集 3A-e3, 2D1000, 2D1015, 2D1030 (1988).
- 5) 楠見ら 第41回日本細胞生物学会大会要旨集. 2WA-1050, 2B-1646, 2B-1722 (1988).