全反射照明蛍光顕微鏡

東京大学 飯野 亮太

第2章 表面・界面の計測法

14節 全反射照明蛍光顕微鏡

1 はじめに

全反射照明蛍光顕微鏡は、観察試料の表面近傍のみを照らすエバネッセント光を局所的な励起光として用いた蛍光顕微鏡である¹⁾。空間的に限定された励起光で背景光を大幅に低減することで、蛍光色素1分子からの微弱光の観察が容易にできる。本稿では、全反射照明蛍光顕微鏡の原理を解説し、筆者らが行ったタンパク質の1分子計測への適用例を紹介する。

2 界面における光の全反射とエバネッセント光

屈折率の高い媒質から低い媒質に向け光を入射する。このとき、入射角がある角度以上(臨界角)になると光は両媒質の界面で全反射する。両媒質の屈折率を $n_1, n_2(n_1>n_2)$ とすると臨界角 θ_c は(1)式で表される。

$$\sin \theta_c = n_2 / n_1 \tag{1}$$

これはスネルの法則で低屈折媒質側の屈折角が90°であるのに相当する。全反射照明蛍光顕微鏡では、屈折率の高い媒質にはガラス $(n_1=1.52)$,低い媒質(生体試料)には水 $(n_2=1.33)$ が用いられ、ガラスと水の界面の臨界角は61.0°となる。

高屈折率側から入射された光が界面で全反射する際、界面の低屈折率媒質側の表面に光が"しみだす"。このしみだした光をエバネッセント光または近接場光という 2 。 エバネッセント光は遠距離には伝播できず、その強度 I は界面から離れるに従い指数関数的に減衰する(図 $\mathbf{1}(\mathbf{a})$)。

$$I = I_0 \exp\left(-\frac{z}{d}\right) \tag{2}$$

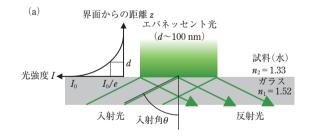
ここで、 I_0 は界面におけるエバネッセント光の強度、z は界面からの距離、d はエバネッセント光の"しみだしの深さ(到達距離)"である。d は媒質の屈折率、光の波長 λ 、および入射角 θ (ただし θ > θ $_c$)によって決まる。

$$d = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{(n_1\sin\theta)^2 - n_2^2}}\tag{3}$$

例えば入射光の波長を 532 nm(2 倍波 YAG レーザ),入射角を 66° とすると,ガラスと水の界面で発生するエバネッセント光の水側へのしみだしの深さは d=106 nm となる。

3 エバネッセント光による照明法:プリズム型と対物レンズ型

エバネッセント光を蛍光顕微鏡の励起光として用いると、ガラス表面から 100 nm 程度の距離に存在



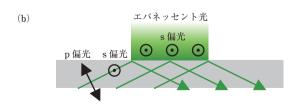


図 1 (a) エバネッセント光のしみこみの深さ(到達距離) (b) エバネッセント光の偏光特性(口絵●参照)

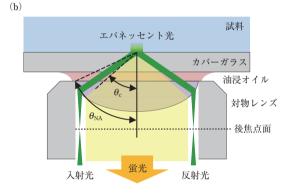


図 2 (a) プリズム型全反射照明法 (b) 対物レンズ型全反射照明法(□絵●参照)

する蛍光色素を選択的に励起することができる。光 学顕微鏡上でエバネッセント光を形成させ照明光に 用いる方法には、プリズム型と対物レンズ型の2種 類がある(図2)。プリズム型と対物レンズ型ともに、 励起光には平行性の高いレーザ光が用いられること が多い。

プリズム型では、試料プレパラートのスライドガラス側に密着させたプリズムにレーザ光を入射してスライドガラス・試料界面で全反射させエバネッセント光を形成させるのが一般的である(図 2(a))¹¹。プリズム型は広い視野を得られるという利点をもつ。一方、対物レンズが接するカバーガラスとは反対側のスライドガラス面上にエバネッセント光を形成するため、観察には試料の厚みを数 10 μm 程度に非常に薄くするか、作動距離が長い対物レンズを使用する必要がある。

プリズム型のこのような欠点を解決する方法とし

て、最近は対物レンズ型が頻繁に使用されている(図 2(b)) 3 。対物レンズ型では、高い開口数(NA)をもつ油浸対物レンズ(NA=1.4以上、最近は $1.45\sim1.49$ のものが主流)の辺縁部からレーザ光を入射しカバーガラスと試料の界面にエバネッセント光を形成させる。高開口数の対物レンズは高倍率(60 倍以上)であるため広い視野の観察は難しいが、顕微鏡の落射照明用ポートからレーザ光を導入するだけで構築できる。また最近は市販のシステムも購入可能である。

4 対物レンズ型全反射照明蛍光顕微鏡の構築

対物レンズの開口数 NA は、焦点位置にある点光源から発せられる光をどのくらいの角度まで集められるかの尺度であり、(4)式であらわされる。

$$NA = n_1 \sin \theta_{NA} \tag{4}$$

ここで θ_{NA} はレンズが光を集めうる最大の角度で あり、 n_1 はガラス(油浸オイル)の屈折率である(図 2(b))。NAが 1.45の対物レンズの θ_{NA} は 72.5°であ る。またガラスと水の界面の臨界角 61.0°は NA= 1.33 に相当する。対物レンズ型全反射照明蛍光顕微 鏡の構築には、この臨界角以上の領域に相当する対 物レンズの辺縁部にレーザ光を入射する必要があ る。対物レンズから出射された光を平行光にしてガ ラスと試料界面への入射角を一定にするため. レン ズ(図3のL1)を用いて対物レンズの後焦点面に レーザ光を集光させる。実際のレーザ光のビーム径 は無限小でなく有限な大きさをもつため、試料面上 で形成できるエバネッセント光の面積は開口数が高 いほど大きくなる。入射角の調整は、L1の手前の 試料面と共役な位置にミラー(M1)を置きその角度 をあおる方法(図 3(a)), および L1 の後に M1 を置 き平行移動させる方法の2種類が一般的である(図 3(b))。図 3(c)は前者(図 3(a))の方法の設置例である。

対物レンズ型に限らず、全反射照明蛍光顕微鏡を利用するうえで注意すべき点は、エバネッセント光の偏光特性である²⁾。全反射により形成されるエバネッセント光は、入射面に垂直な p 偏光方向の成分はほとんど打ち消され、入射面に平行な s 偏光の成分のみをもつ(図 1(b))。このため 1 方向のみから光を入射して形成させたエバネッセント光は、ガラス表面に平行な平面において大きく偏光している。

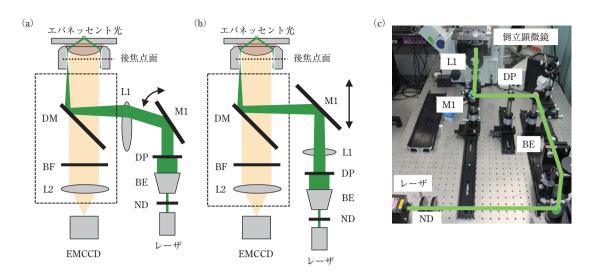


図3 プリズム型全反射照明蛍光顕微鏡の構築法(口絵6参照)

ND:減光フィルター, BE:ビームエキスパンダー, DP: 視野絞り, L1:レンズ, M1:ミラー, DM:ダイクロイックミラー, BF:バリアフィルター, L2:第2対物レンズ。破線は顕微鏡内部の部品を示す。(a)L1の前, 試料面と共役な位置に M1を置いて角度をあおる方法。(b)L1の後に M1を置いて平行移動する方法。(c)(a)の方式の構築例

よってガラス表面に強固に結合した個々の蛍光色素は、エバネッセント光の偏光方向に対して遷移モーメントがどちらを向いているかで励起効率が大きく異なり、蛍光強度に大きなばらつきが生じる。この問題を解決するため、直交する2方向から光を入射する方法や4、リング状の入射光を用いて試料面上の蛍光色素の向きによらず一定の蛍光強度を得る輪帯全反射照明法が開発されている5060。またこの性質を逆手に取り、対物レンズ辺縁部に沿って入射位置を周期的に回転させることでエバネッセント光の偏光の向きを一定周期で回転させ、タンパク質に強固に結合させた1分子の蛍光色素の向きからタンパク質自身の構造変化を検出する方法も報告されている7080。

5 蛍光色素の1分子観察

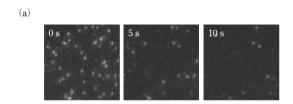
最近は EMCCD カメラ等の検出器の高感度化や 顕微鏡内部の光学部品が発する背景光の低減により、水溶液中の蛍光色素の1分子観察は比較的容易 に達成できる。半ば観えて当然になっており、学生 に画像を見せてもとくに感動しない。しかしながら これが初めて達成された1995年以前には、可能だ と考えている研究者は多くはなかった。柳田は結像 光学系の透過効率や検出器の感度等に基づいた計算から、蛍光色素1分子は十分検出可能な数の光子を発生していると指摘していた。問題は感度でなくむしろ背景光の高さであった。昼間に星が見えないのと同じ理屈である。1分子蛍光観察のための背景光の大幅な低減に適用されたのがプリズム型全反射照明蛍光顕微鏡であった⁹⁾。また木下らは、落射蛍光顕微鏡でも背景光の要因を丁寧に取り除けば1分子蛍光観察が可能であることをほぼ同時期に示した¹⁰⁾。このように蛍光色素1分子の観察の実現には日本の研究者達の努力が大きく貢献した。筆者が学生時代に化学専攻から生物物理学に転向したのは、彼らの成果に多大な感銘を受けたからである。

対物レンズ型全反射照明蛍光顕微鏡による蛍光色素 Cy3の観察例を図 4(a)に示す。白く光る個々の輝点が1分子の Cy3 に相当する。時間とともに輝点の数が減っているのは分子がなくなったのではなく褪色しているからである。褪色は励起された蛍光色素が活性酸素等のラジカル種と反応して蛍光を発しない構造に不可逆的に変化することで起こる¹¹⁾。褪色は確率的に起こり、水溶液中の酸素を除去することで褪色までの時間をある程度長くすることも可能である。図 4(b)には別の蛍光色素、Atto647 の蛍光強度の時間変化を示す。矢印の点で突然、蛍光強度が背景光のレベルまで落ちているのがわかる。こ

のような不可逆的な1段階での褪色が1分子の蛍光色素の特徴であり、1分子レベルで検出できているかの簡便な指標としてよく用いられる。1分子計測によく用いられる Cy3 やテトラメチルローダミンといった蛍光色素は、褪色するまでに10⁷~10⁸個程度の光子を放出する¹²⁾。顕微鏡システム全体の光子の検出効率は1%程度なので、褪色までに放出される10⁵~10⁶個程度の光子を用いて観察を行うことになる。励起光の強度を上げると励起の頻度が追くなり、単位時間あたりに放出される光子の数が増加するのでシグナルも増加するが、観察可能時間は短くなる。分子吸光係数と量子収率がともに高い上短くなる。分子吸光係数と量子収率がともに高い上度、達成可能な時間分解能は最高で1ミリ秒程度である。

6 応用例:生きた細胞内の緑色蛍光タンパ ク質の1分子観察

ちょっと古い話になるが、筆者が最初に取り組んだ観察例を紹介する。ほ乳類培養細胞膜上の膜タンパク質の1分子観察である¹³⁾。膜タンパク質を標的



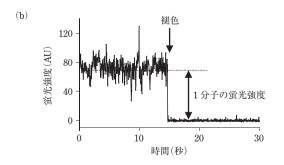


図4 蛍光色素の1分子観察

(a) Cy3 の観察画像(30 μ m×30 μ m)。ICCD カメラを用い 30 フレーム/秒で撮影。励起光強度:1 μ W/ μ m²、(b) Atto647 の蛍光強度の時間変化の例。15 秒付近(矢印)で褪色が起きている。

にしたのは、細胞膜中のタンパク質の拡散運動は細胞質中のタンパク質のそれに比べ格段に遅いので観察しやすいと考えたからである。タンパク質を標識する蛍光色素としては、標的タンパク質と遺伝子レベルで融合できる緑色蛍光タンパク質(GFP)を選んだ。細胞に発現させた GFP融合タンパク質の1分子イメージングが可能になれば、どんなタンパク質の1分子観察も原理的には可能になると考えたからである。他のグループとの競争もあり、Cy3等で標識した膜タンパク質の1分子観察は先を越されていたが $^{14)15)}$ 、GFPはまだ精製された試料の1分子観察が報告されていたのみであった $^{16)\sim18)}$ 。

実は実験に取り組む前には、自家蛍光が高い(と考えられていた)細胞内で GFP1 分子を観察するのは難しいだろうと、複数の方からコメントをいただいていた。しかしながら自作の対物レンズ型全反射照明顕微鏡で実際に観てみると、初めてのトライであっけなく簡単に成功してしまった(図5左)。細胞膜上を多数の輝点が動き回っていた。あのときの感動は今でも覚えている。まさに案ずるより産むがやすしである。輝点の蛍光強度(分子の会合数)と運動性の相関を調べたところ、数分子が会合体を形成するだけで運動性が著しく低下することが明らかになり、膜タンパク質の新しい運動制御モデルを提案することができた。これが筆者の初めての原著論文となった。

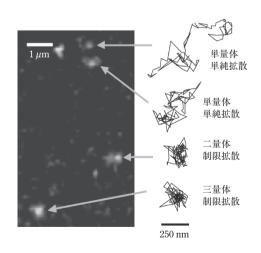


図5 生きた細胞での GFP 融合膜タンパク質の 1 分子観察例 輝点の軌跡から運動性が、蛍光強度から会合数が計測で きる。数分子が会合すると膜上での運動性が大きく制限 される。

第4編 バイオマテリアルの評価

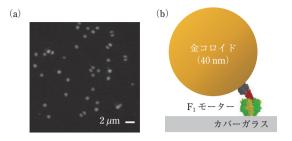
細胞内での GFP 融合タンパク質の1分子観察に成功したポイントは、発現量が非常に低い細胞を丁寧にスクリーニングしたことであった。全反射照明蛍光顕微鏡の横方向の空間分解能は通常の光学顕微鏡と変わらず、観察波長の1/2 程度である。よって、細胞膜上での密度が高すぎると個々の分子を識別することは困難となる。一方、密度が十分低く1分子を識別できれば、その分子の像(点像分布関数)の中心位置は空間分解能よりも高い精度(数 nm ~数10 nm)で決定することができ¹⁹、運動の軌跡を追跡することが可能である(図 5 右)。

筆者はその後もしばらくは細胞を対象とした1分子蛍光観察法の開発に携わり、波長特性の異なる2種の蛍光色素1分子間の共鳴エネルギー移動(いわゆる FRET)や2色同時観察で異種分子間の複合体形成のダイナミクスを計測する方法を報告した2021)。興味のある方は原著論文を参照されたい。

7 蛍光以外への応用例:全反射照明暗視野 顕微鏡

エバネッセント光は蛍光色素の励起以外にも用いることができる。筆者らは最近、対物レンズ型照明法を適用した新しい暗視野顕微鏡を開発したので最後に紹介したい(図 6) 22)。暗視野照明法は蛍光ではなく散乱光を検出する方法であり、直径数 $10~\rm nm$ の金コロイドや数 $100~\rm nm$ のポリスチレンビーズを高いシグナル/ノイズ比($\rm S/N$ 比)で観察できる。 $\rm S/N$ 比が高いため $1~\rm \mu s$ といった高い時間分解能での観察が可能であり、さらに蛍光色素と異なり褪色は起こらないので長時間観察ができる。金コロイドやポリスチレンビーズはタンパク質よりも大きいので機能を阻害する可能性もあるが、これらの比較的大きなプローブをつけてもタンパク質で出来た生体分子機械は問題なく働く場合が意外と多い。

我々の暗視野法は非常にシンプルで、図3の対物レンズ型光学系のダイクロイックミラー(DM)を、中心に穴の開いたミラーに交換するだけである。金コロイドで散乱された光は中心の穴を通って検出器に到達する。穴を通ることで対物レンズの実効開口数が低下し、プローブの像(点像分布関数)は若干広がるが、高い精度で位置を決めることはできる。図6は回転モータータンパク質 F.-ATPase の回転



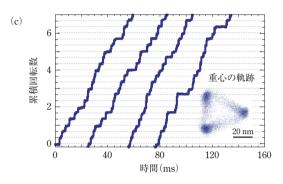


図 6 全反射照明暗視野顕微鏡による F₁ モーターの 1 分 子回転観察(口絵●参照)

(a) 直径 40 nm の金コロイドの観察像、(b) F_1 モーターの回転実験の模式図、(c) 累積回転数の時間変化。挿入図は金コロイドの重心の軌跡。 120° 離れた3ヵ所で停止しながら回転している

運動を $10 \mu s$ の時間分解能で観察した例である。1 秒間に数百回転という高速回転中のステップと停止が明確に見えており、 F_1 -ATPase がステッピングモーターであることが明確に観察できている。本手法はまた、リニアモータータンパク質である myosin VI のステップ型直進運動の詳細な解析にも適用されている²³⁾。この手法はさらに、蛍光像と散乱像の同時観察にも容易に適用できる。モータータンパク質の運動の素過程と蛍光性基質の結合・解離のタイミングの同時計測にも活用できると期待している²⁴⁾²⁵⁾。

⋒ 結語

全反射照明蛍光顕微鏡に限らず、顕微鏡を使った 研究の醍醐味は、世界でまだ誰も観たことのない映像を初めて目の当たりにするチャンスに巡り合える ことだと思う。皆さんにもこの喜びをぜひ体験して いただきたい。また全反射照明蛍光顕微鏡を用いた 1分子蛍光観察は最近,超解像蛍光顕微鏡^{26)~28)} や 1分子 DNA シークエンシング²⁹⁾,1分子プルダウンアッセイ³⁰⁾などに発展しており,商業的にも大きな注目を集めている。しかしながらこれらの成果が日本でなく米国の研究グループから発信されているのは忸怩たる思いである。筆者自身も含め、日本の研究グループは1分子観察法の応用への展開をもっと真剣に考える必要があると考える。

●謝辞

本稿の図4のデータは榎佐和子博士,池田朋宏博士に提供していただいた。この場を借りて感謝する。

【引用・参考文献】

- 1) D. Axelrod: Methods Cell Biol., 30, 245-270 (1989).
- 2) D. Axelrod, T.P. Burghardt and N.L. Thompson: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 13, 247-268 (1984).
- M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, A.H. Iwane and T. Yanagida: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235, 47–53 (1997).
- M.G. Bell, R.E. Dale, U.A. van der Heide and Y.E. Goldman: *Biothys. L.* 83, 1050-1073 (2002).
- 5) H. Makyio, R. Iino, C. Ikeda, H. Imamura, M. Tamakoshi, M. Iwata, D. Stock, R.A. Bernal, E.P. Carpenter, M. Yoshida, K. Yokoyama and S. Iwata: *EMBO J.*, **24**, 3974–3983 (2005).
- K. Adachi, K. Oiwa, T. Nishizaka, S. Furuike, H. Noji, H. Itoh, M. Yoshida and K. Kinosita, Jr.: Cell, 130, 309–321 (2007).
- T. Nishizaka, K. Oiwa, H. Noji, S. Kimura, E. Muneyuki, M. Yoshida and K. Kinosita, Jr.: *Nature Struct. Mol. Biol.*, 11, 142–148 (2004).
- T. Masaike, F. Koyama-Horibe, K. Oiwa, M. Yoshida and T. Nishizaka: *Nature Struct. Mol. Biol.*, 15, 1326– 1333 (2008).
- T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito and T. Yanagida: *Nature*, 374, 555-559 (1995).
- I. Sase, H. Miyata, J.E. Corrie, J.S. Craik and K. Kinosita, Jr. : *Biophys. J.*, 69, 323–328 (1995).
- 11) T. Ha and P. Tinnefeld: Ann. Rev. Phys. Chem., 63, 595-617 (2012).
- 12) X.S. Xie and J.K. Trautman: Ann. Rev. Phys. Chem., 49, 441–480 (1998).
- R. Iino, I. Koyama and A. Kusumi : *Biophys. J.*, 80, 2667–2677 (2001).

- 14) Y. Sako, S. Minoghchi and T. Yanagida: *Nature Cell Biol.*, 2, 168-172 (2000).
- M. Ueda, Y. Sako, T. Tanaka, P. Devreotes and T. Yanagida: Science, 294, 864–867 (2001).
- 16) A.H. Iwane, T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, O. Ohara, S. Morimoto and T. Yanagida: FEBS Lett., 407, 235–238 (1997).
- 17) D.W. Pierce, N. Hom-Booher and R.D. Vale: *Nature*, 388, 338(1997).
- 18) R.M. Dickson, A.B. Cubitt, R.Y. Tsien and W.E. Moerner: *Nature*, 388, 355–358 (1997).
- A. Yildiz, J.N. Forkey, S.A. McKinney, T. Ha, Y.E. Goldman and P.R. Selvin: Science, 300, 2061-2065 (2003).
- 20) H. Murakoshi, R. Iino, T. Kobayashi, T. Fujiwara, C. Ohshima, A. Yoshimura and A. Kusumi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7317–7322 (2004).
- I. Koyama-Honda, K. Ritchie, T. Fujiwara, R. Iino, H. Murakoshi, R.S. Kasai and A. Kusumi: *Biophys. J.*, 88, 2126–2136 (2005).
- 22) H. Ueno, S. Nishikawa, R. Iino, K.V. Tabata, S. Sakakihara, T. Yanagida and H. Noji: *Biophys. J.*, 98, 2014–2023 (2010).
- 23) S. Nishikawa, I. Arimoto, K. Ikezaki, M. Sugawa, H. Ueno, T. Komori, A.H. Iwane and T. Yanagida: Cell, 142, 879–888 (2010).
- 24) A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka and T. Yanagida: Cell, 92, 161–171 (1998).
- 25) T. Sakamoto, M.R. Webb, E. Forgacs, H.D. White and J.R. Sellers: *Nature*, 455, 128–132 (2008).
- 26) S.T. Hess, T.P. Girirajan and M.D. Mason: *Biophys. J.*, 91, 4258–4272 (2006).
- 27) E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz and H.F. Hess: *Science*, **313**, 1642–1645 (2006).
- 28) M.J. Rust, M. Bates and X. Zhuang: Nature Methods, 3, 793-795 (2006).
- 29) T.D. Harris, P.R. Buzby, H. Babcock, E. Beer, J. Bowers, I. Braslavsky, M. Causey, J. Colonell, J. Dimeo, J.W. Efcavitch, E. Giladi, J. Gill, J. Healy, M. Jarosz, D. Lapen, K. Moulton, S.R. Quake, K. Steinmann, E. Thayer, A. Tyurina, R. Ward, H. Weiss and Z. Xie: Science, 320, 106-109 (2008).
- 30) A. Jain, R. Liu, B. Ramani, E. Arauz, Y. Ishitsuka, K. Ragunathan, J. Park, J. Chen, Y.K. Xiang and T. Ha: Nature, 473, 484–488 (2011).

く飯野 売太>